(19)日本国特許庁(JP)

再公表特許(A1)

(11)国際公開番号
WO2003/085119

発行日　平成17年8月11日(2005.8.11)

(43)国際公開日　平成15年10月16日(2003.10.16)

(51)Int.Cl.[7]	F I		
C07K 16/28	C07K	16/28	ZNA
C12N 1/15	C12N	1/15	
C12N 1/19	C12N	1/19	
C12N 1/21	C12N	1/21	
C12N 5/10	C12P	21/02	C

審査請求 未請求　予備審査請求 有　（全 197 頁）　最終頁に続く

出願番号	特願2003-582297(P2003-582297)
(21)国際出願番号	PCT/JP2003/004504
(22)国際出願日	平成15年4月9日(2003.4.9)
(31)優先権主張番号	特願2002-106950(P2002-106950)
(32)優先日	平成14年4月9日(2002.4.9)
(33)優先権主張国	日本国(JP)
(81)指定国	AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HU,IE,IT,LU,MC,NL,PT,RO,SE,SI,SK,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,NI,NO,NZ,OM,PH,PL,PT,RO,RU,SC,SD,SE,SG,SK,SL,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,YU,ZA,ZM,ZW

(71)出願人　000001029
協和醗酵工業株式会社
東京都千代田区大手町１丁目６番１号
(74)代理人　100105647
弁理士　小栗　昌平
(74)代理人　100105474
弁理士　本多　弘徳
(74)代理人　100108589
弁理士　市川　利光
(74)代理人　100115107
弁理士　高松　猛
(74)代理人　100090343
弁理士　濱田　百合子

最終頁に続く

(54)【発明の名称】抗体組成物のＦｃγ受容体ＩＩＩａに対する結合活性を高める方法

(57)【要約】
抗体組成物のＦｃγ受容体ＩＩＩａに対する結合活性を高める方法、抗体組成物の抗体依存性細胞障害活性を高める方法、抗体組成物中に含まれるＦｃ領域に結合する全Ｎ－グリコシド結合複合型糖鎖のうち、糖鎖還元末端のＮ－アセチルグルコサミンにフコースが結合していない糖鎖の割合を検出する方法、抗体依存性細胞障害活性を検出する方法、Ｎ－グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のＮ－アセチルグルコサミンの６位とフコースの１位がα結合した糖鎖構造を認識するレクチンに耐性を有する細胞を用いて製造されたＦｃ融合蛋白質組成物、およびその製造方法。

【特許請求の範囲】
【請求項１】
抗体分子のＦｃ領域に結合するＮ－グリコシド結合複合型糖鎖を修飾することを含む、抗体組成物のＦｃγ受容体ＩＩＩａに対する結合活性を高める方法。
【請求項２】
抗体分子のＦｃ領域に結合するＮ－グリコシド結合複合型糖鎖の修飾が、Ｎ－グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のＮ－アセチルグルコサミンの６位にフコースの１位がα結合していない糖鎖を抗体分子のＦｃ領域に結合させることである、請求の範囲１に記載の方法。
【請求項３】
糖鎖が、Ｎ－グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のＮ－アセチルグルコサミンにフコースを結合する糖鎖の修飾に関与する蛋白質の活性が低下または欠失した細胞が合成する糖鎖であることを特徴とする、請求の範囲１または２に記載の方法。
【請求項４】
Ｎ－グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のＮ－アセチルグルコサミンにフコースを結合する糖鎖の修飾に関与する蛋白質が、以下の（ａ）、（ｂ）および（ｃ）からなる群から選ばれる蛋白質である、請求の範囲３に記載の方法。
（ａ）細胞内糖ヌクレオチドＧＤＰ－フコースの合成に関与する蛋白質；
（ｂ）Ｎ－グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のＮ－アセチルグルコサミンの６位にフコースの１位がα結合する糖鎖修飾に関与する蛋白質；
（ｃ）細胞内糖ヌクレオチドＧＤＰ－フコースのゴルジ体への輸送に関与する蛋白質。
【請求項５】
細胞が、Ｎ－グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のＮ－アセチルグルコサミンの６位にフコースの１位がα結合した糖鎖構造を認識するレクチンに耐性を有する細胞である、請求の範囲３または４に記載の方法。
【請求項６】
細胞が、少なくとも、以下の（ａ）、（ｂ）、（ｃ）および（ｄ）からなる群から選ばれるレクチンの一つに耐性である、請求の範囲３～５のいずれか１項に記載の方法。
（ａ）レンズマメレクチン；
（ｂ）エンドウマメレクチン；
（ｃ）ソラマメレクチン；
（ｄ）ヒイロチャワンタケレクチン。
【請求項７】
細胞が、酵母、動物細胞、昆虫細胞および植物細胞からなる群から選ばれる細胞である、請求の範囲３～６のいずれか１項に記載の方法。
【請求項８】
細胞が、以下の（ａ）～（ｉ）からなる群から選ばれる細胞である、請求の範囲３～７のいずれか１項に記載の方法。
（ａ）チャイニーズハムスター卵巣組織由来ＣＨＯ細胞；
（ｂ）ラットミエローマ細胞株ＹＢ２／３ＨＬ．Ｐ２．Ｇ１１．１６Ａｇ．２０細胞；
（ｃ）シリアンハムスター腎臓組織由来ＢＨＫ細胞；
（ｄ）マウスミエローマ細胞株ＮＳＯ細胞
（ｅ）マウスミエローマ細胞株ＳＰ２／０－Ａｇ１４細胞
（ｆ）ハイブリドーマ細胞；
（ｇ）ヒト白血病細胞株ナマルバ細胞；
（ｈ）胚性幹細胞；
（ｉ）受精卵細胞。
【請求項９】
抗体分子が、以下の（ａ）、（ｂ）、（ｃ）および（ｄ）からなる群から選ばれる抗体分子である、請求の範囲１～８のいずれか１項に記載の方法。

（ａ）ヒト抗体；
（ｂ）ヒト化抗体；
（ｃ）（ａ）または（ｂ）のＦｃ領域を含む抗体の断片；
（ｄ）（ａ）または（ｂ）のＦｃ領域を有する融合蛋白質。
【請求項１０】
抗体分子のクラスがＩｇＧである、請求の範囲１～９のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１１】
抗体分子のＦｃ領域に結合するＮ－グリコシド結合複合型糖鎖において、全Ｎ－グリコシド結合複合型糖鎖のうち、糖鎖還元末端のＮ－アセチルグルコサミンの６位にフコースの１位がα結合していない糖鎖の割合が２０％以上である、請求の範囲１～１０のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１２】
請求の範囲１～１１のいずれか１項に記載の方法により、抗体組成物の抗体依存性細胞障害活性を高める方法。
【請求項１３】
抗体分子のＦｃ領域に結合するＮ－グリコシド結合複合型糖鎖を修飾することを含む、抗体組成物のＦｃγ受容体ＩＩＩａに対する結合活性が高められた抗体組成物を製造する方法。
【請求項１４】
抗体分子のＦｃ領域に結合するＮ－グリコシド結合複合型糖鎖の修飾が、Ｎ－グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のＮ－アセチルグルコサミンの６位にフコースの１位がα結合していない糖鎖を抗体分子のＦｃ領域に結合させることである、請求の範囲１３に記載の方法。
【請求項１５】
糖鎖が、Ｎ－グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のＮ－アセチルグルコサミンにフコースを結合する糖鎖の修飾に関与する蛋白質の活性が低下または欠失した細胞が合成する糖鎖であることを特徴とする、請求の範囲１３または１４に記載の方法。
【請求項１６】
Ｎ－グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のＮ－アセチルグルコサミンにフコースを結合する糖鎖の修飾に関与する蛋白質が、以下の（ａ）、（ｂ）および（ｃ）からなる群から選ばれる蛋白質である、請求の範囲１５に記載の方法。
（ａ）細胞内糖ヌクレオチドＧＤＰ－フコースの合成に関与する蛋白質；
（ｂ）Ｎ－グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のＮ－アセチルグルコサミンの６位にフコースの１位がα結合する糖鎖修飾に関与する蛋白質；
（ｃ）細胞内糖ヌクレオチドＧＤＰ－フコースのゴルジ体への輸送に関与する蛋白質。
【請求項１７】
細胞が、Ｎ－グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のＮ－アセチルグルコサミンの６位にフコースの１位がα結合した糖鎖構造を認識するレクチンに耐性を有する細胞である、請求の範囲１５または１６に記載の方法。
【請求項１８】
細胞が、少なくとも、以下の（ａ）、（ｂ）、（ｃ）および（ｄ）からなる群から選ばれるレクチンの一つに耐性である、請求の範囲１５～１７のいずれか１項に記載の方法。
（ａ）レンズマメレクチン；
（ｂ）エンドウマメレクチン；
（ｃ）ソラマメレクチン；
（ｄ）ヒイロチャワンタケレクチン。
【請求項１９】
細胞が、酵母、動物細胞、昆虫細胞および植物細胞からなる群から選ばれる細胞である、請求の範囲１５～１８のいずれか１項に記載の方法。
【請求項２０】

細胞が、以下の（ａ）～（ｉ）からなる群から選ばれる細胞である、請求の範囲１５～１９のいずれか１項に記載の方法。
（ａ）チャイニーズハムスター卵巣組織由来ＣＨＯ細胞；
（ｂ）ラットミエローマ細胞株ＹＢ２／３ＨＬ．Ｐ２．Ｇ１１．１６Ａｇ．２０細胞；
（ｃ）シリアンハムスター腎臓組織由来ＢＨＫ細胞；
（ｄ）マウスミエローマ細胞株ＮＳＯ細胞
（ｅ）マウスミエローマ細胞株ＳＰ２／０－Ａｇ１４細胞
（ｆ）ハイブリドーマ細胞；
（ｇ）ヒト白血病細胞株ナマルバ細胞；
（ｈ）胚性幹細胞；
（ｉ）受精卵細胞。
【請求項２１】
抗体分子が、以下の（ａ）、（ｂ）、（ｃ）および（ｄ）からなる群から選ばれる抗体分子である、請求の範囲１３～２０のいずれか１項に記載の方法。
（ａ）ヒト抗体；
（ｂ）ヒト化抗体；
（ｃ）（ａ）または（ｂ）のＦｃ領域を含む抗体の断片；
（ｄ）（ａ）または（ｂ）のＦｃ領域を有する融合蛋白質。
【請求項２２】
抗体分子のクラスがＩｇＧである、請求の範囲１３～２１のいずれか１項に記載の方法。
【請求項２３】
抗体分子のＦｃ領域に結合するＮ－グリコシド結合複合型糖鎖において、全Ｎ－グリコシド結合複合型糖鎖のうち、糖鎖還元末端のＮ－アセチルグルコサミンの６位にフコースの１位がα結合していない糖鎖の割合が２０％以上である、請求の範囲１３～２２のいずれか１項に記載の方法。
【請求項２４】
請求の範囲１２の方法を含む、抗体依存性細胞障害活性が高い抗体組成物を製造する方法。
【請求項２５】
請求の範囲１３～２４のいずれか１項に記載の製造方法により製造される抗体組成物。
【請求項２６】
抗原と被験抗体組成物とを反応させて抗原と抗体組成物の複合体を形成し、該複合体をＦｃγ受容体ＩＩＩａと接触させてＦｃγ受容体ＩＩＩａに対する結合活性を測定し、スタンダードの抗体組成物中の糖鎖の割合とＦｃγ受容体ＩＩＩａに対する結合活性を示す検量線と比較することにより、抗体組成物中に含まれるＦｃ領域に結合する全Ｎ－グリコシド結合複合型糖鎖のうち、糖鎖還元末端のＮ－アセチルグルコサミンにフコースが結合していない糖鎖の割合を検出する方法。
【請求項２７】
抗原と被験抗体組成物とを反応させたて抗原と抗体組成物の複合体を形成し、該複合体をＦｃγ受容体ＩＩＩａと接触させ、Ｆｃγ受容体ＩＩＩａに対する結合活性を測定し、スタンダードの抗体組成物の抗体依存性細胞障害活性とＦｃγ受容体ＩＩＩａに対する結合活性を示す検量線と比較することにより、抗体組成物の抗体依存性細胞障害活性を検出する方法。
【請求項２８】
被験抗体組成物とＦｃγ受容体ＩＩＩａとを接触させ、抗体組成物とＦｃγ受容体ＩＩＩａとの結合活性を測定し、スタンダードの抗体組成物中の糖鎖の割合とＦｃγ受容体ＩＩＩａとの結合活性を示す検量線と比較することにより、抗体組成物中に含まれるＦｃ領域に結合する全Ｎ－グリコシド結合複合型糖鎖のうち、糖鎖還元末端のＮ－アセチルグルコサミンにフコースが結合していない糖鎖の割合を検出する方法。
【請求項２９】

被験抗体組成物とＦｃγ受容体ＩＩＩａとを接触させ、抗体組成物とＦｃγ受容体ＩＩＩａとの結合活性を測定し、スタンダードの抗体組成物の抗体依存性細胞障害活性とＦｃγ受容体ＩＩＩａとの結合活性を示す検量線と比較することにより、抗体組成物の抗体依存性細胞障害活性を検出する方法。

【請求項３０】

Ｎ－グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のＮ－アセチルグルコサミンの６位とフコースの１位がα結合した糖鎖構造を認識するレクチンに耐性を有する細胞を用いて製造されたＦｃ融合蛋白質組成物。

【請求項３１】

細胞が、以下の（ａ）、（ｂ）および（ｃ）からなる群から選ばれる蛋白質の活性が低下または欠失した細胞である、請求の範囲３０に記載のＦｃ融合蛋白質組成物。

（ａ）細胞内糖ヌクレオチドＧＤＰ－フコースの合成に関与する酵素蛋白質；

（ｂ）Ｎ－グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のＮ－アセチルグルコサミンの６位にフコースの１位がα結合する糖鎖修飾に関与する酵素蛋白質；

（ｃ）細胞内糖ヌクレオチドＧＤＰ－フコースのゴルジ体への輸送に関与する蛋白質。

【請求項３２】

細胞が、少なくとも、以下の（ａ）、（ｂ）、（ｃ）および（ｄ）からなる群から選ばれるレクチンの一つに耐性である、請求の範囲３０または３１に記載のＦｃ融合蛋白質組成物。

（ａ）レンズマメレクチン；

（ｂ）エンドウマメレクチン；

（ｃ）ソラマメレクチン；

（ｄ）ヒイロチャワンタケレクチン。

【請求項３３】

細胞が、Ｆｃ融合蛋白質をコードする遺伝子を導入した細胞である、請求の範囲３０～３２のいずれか１項に記載のＦｃ融合蛋白質組成物。

【請求項３４】

Ｆｃが抗体分子のＩｇＧクラス由来である、請求の範囲３３に記載のＦｃ融合蛋白質組成物。

【請求項３５】

細胞が、酵母、動物細胞、昆虫細胞および植物細胞からなる群から選ばれる細胞である、請求の範囲３０～３４のいずれか１項に記載のＦｃ融合蛋白質組成物。

【請求項３６】

細胞が、マウスミエローマ細胞である、請求の範囲３０～３５のいずれか１項に記載のＦｃ融合蛋白質組成物。

【請求項３７】

マウスミエローマ細胞が、ＮＳＯ細胞またはＳＰ２／０－Ａｇ１４細胞である請求の範囲３６記載のＦｃ融合蛋白質組成物。

【請求項３８】

細胞が、以下の（ａ）～（ｇ）からなる群から選ばれる細胞である、請求の範囲３０～３７のいずれか１項に記載のＦｃ融合蛋白質組成物。

（ａ）チャイニーズハムスター卵巣組織由来ＣＨＯ細胞；

（ｂ）ラットミエローマ細胞株ＹＢ２／３ＨＬ．Ｐ２．Ｇ１１．１６Ａｇ．２０細胞；

（ｃ）シリアンハムスター腎臓組織由来ＢＨＫ細胞；

（ｄ）抗体を生産するハイブリドーマ細胞；

（ｅ）ヒト白血病細胞株ナマルバ細胞；

（ｆ）胚性幹細胞；

（ｇ）受精卵細胞。

【請求項３９】

Ｎ－グリコシド結合複合型糖鎖を抗体分子のＦｃ領域に有するＦｃ融合蛋白質からなる組

成物であって、該組成物中に含まれるＦｃ領域に結合する全Ｎ－グリコシド結合複合型糖鎖のうち、糖鎖還元末端のＮ－アセチルグルコサミンにフコースが結合していない糖鎖の割合が２０％以上であるＦｃ融合蛋白質組成物。

【請求項４０】

フコースが結合していない糖鎖が、該フコースの１位がＮ－グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のＮ－アセチルグルコサミンの６位にα結合していない糖鎖である、請求の範囲３９に記載のＦｃ融合蛋白質組成物。

【請求項４１】

抗体分子のクラスがＩｇＧである、請求の範囲３９または４０に記載のＦｃ融合蛋白質組成物。

【請求項４２】

Ｆｃ融合蛋白質組成物が、Ｆｃ融合繊維芽細胞増殖因子－８である請求の範囲３０～４１のいずれか１項に記載のＦｃ融合蛋白質組成物。

【請求項４３】

請求の範囲３０～４２のいずれか１項に記載のＦｃ融合蛋白質組成物を生産する細胞。

【請求項４４】

細胞が、酵母、動物細胞、昆虫細胞および植物細胞からなる群から選ばれる、請求の範囲４３に記載の細胞。

【請求項４５】

細胞が、マウスミエローマ細胞である、請求の範囲４３または４４に記載の細胞。

【請求項４６】

マウスミエローマ細胞が、ＮＳＯ細胞またはＳＰ２／０－Ａｇ１４細胞である請求の範囲４５に記載の細胞。

【請求項４７】

細胞が、以下の（ａ）～（ｇ）からなる群から選ばれる細胞である、請求の範囲４３～４６のいずれか１項に記載の細胞。

（ａ）チャイニーズハムスター卵巣組織由来ＣＨＯ細胞；

（ｂ）ラットミエローマ細胞株ＹＢ２／３ＨＬ．Ｐ２．Ｇ１１．１６Ａｇ．２０細胞；

（ｃ）シリアンハムスター腎臓組織由来ＢＨＫ細胞；

（ｄ）抗体を生産するハイブリドーマ細胞；

（ｅ）ヒト白血病細胞株ナマルバ細胞；

（ｆ）胚性幹細胞；

（ｇ）受精卵細胞。

【請求項４８】

請求の範囲４３～４７のいずれか１項に記載の細胞を培地に培養し、培養物中にＦｃ融合蛋白質組成物を生成蓄積させ、該培養物からＦｃ融合蛋白質組成物を採取する工程を含む、Ｆｃ融合蛋白質組成物の製造方法。

【発明の詳細な説明】

技術分野

本発明は、抗体組成物のＦｃγ受容体ＩＩＩａに対する結合活性を高める方法、抗体組成物の抗体依存性細胞障害活性を高める方法、抗体組成物のＦｃγ受容体ＩＩＩａに対する結合活性を高められた抗体組成物を製造する方法、抗体組成物中に含まれるＦｃ領域に結合する全Ｎ－グリコシド結合複合型糖鎖のうち、糖鎖還元末端のＮ－アセチルグルコサミンにフコースが結合していない糖鎖の割合を検出する方法、Ｎ－グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のＮ－アセチルグルコサミンの６位とフコースの１位がα結合した糖鎖構造を認識するレクチンに耐性を有する細胞を用いて製造されたＦｃ融合蛋白質組成物、およびその製造方法に関する。

背景技術

抗体は、高い結合活性、結合特異性および血中での高い安定性を有することから、ヒトの各種疾患の診断、予防および治療への応用が試みられてきた［モノクローナル・アンティ

ボディズ：プリンシプルズ・アンド・アプリケーションズ（Ｍｏｎｏｃｌｏｎａｌ Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ：Ｐｒｉｎｃｉｐｌｅｓ ａｎｄ Ａｐｐｌｉｃａｔｉｏｎｓ），Ｗｉｌｅｙ－Ｌｉｓｓ，Ｉｎｃ．，Ｃｈａｐｔｅｒ ２．１（１９９５）］。また、遺伝子組換え技術を利用して、ヒト以外の動物の抗体からヒト型キメラ抗体或いはヒト型相補性決定領域（以下、ＣＤＲと表記する）移植抗体の様なヒト化抗体を作製することが試みられている。ヒト型キメラ抗体とは、抗体Ｖ領域（以下、Ｖ領域と表記する）がヒト以外の動物の抗体で、定常領域（以下、Ｃ領域と表記する）がヒト抗体である抗体である。ヒト型ＣＤＲ移植抗体とは、ヒト抗体のＣＤＲをヒト以外の動物の抗体のＣＤＲと置換した抗体である。

哺乳類の抗体には、ＩｇＭ、ＩｇＤ、ＩｇＧ、ＩｇＡ、ＩｇＥの５種類のクラスが存在することが明らかとなっているが、ヒトの各種疾患の診断、予防および治療には血中半減期が長く、各種エフェクター機能を有する等の機能特性からヒトＩｇＧクラスの抗体が主として利用されている［モノクローナル・アンティボディズ：プリンシプルズ・アンド・アプリケーションズ（Ｍｏｎｏｃｌｏｎａｌ Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ：Ｐｒｉｎｃｉｐｌｅｓ ａｎｄ Ａｐｐｌｉｃａｔｉｏｎｓ），Ｗｉｌｅｙ－Ｌｉｓｓ，Ｉｎｃ．，Ｃｈａｐｔｅｒ １（１９９５）］。ヒトＩｇＧクラスの抗体は、更にＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３、ＩｇＧ４の４種類のサブクラスに分類されている。ＩｇＧクラスの抗体のエフェクター機能である抗体依存性細胞障害活性（以下、ＡＤＣＣ活性と表記する）や補体依存性細胞障害活性（以下、ＣＤＣ活性と表記する）については、これまでに多数の研究が行われ、ヒトＩｇＧクラスでは、ＩｇＧ１サブクラスの抗体が最も高いＡＤＣＣ活性、ＣＤＣ活性を有していることが報告されている［ケミカル・イムノロジー（Ｃｈｅｍｉｃａｌ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ），６５，８８（１９９７）］。以上の観点から、市販のリツキサン、ハーセプチンを始めとして、その効果発現に高いエフェクター機能を必要とする抗腫瘍ヒト化抗体の殆どはヒトＩｇＧ１サブクラスの抗体である。

ヒトＩｇＧ１サブクラスの抗体のＡＤＣＣ活性およびＣＤＣ活性の発現には、抗体Ｆｃ領域と、キラー細胞、ナチュラルキラー細胞、単球、マクロファージ等のエフェクター細胞表面上に存在する抗体レセプター（以下、ＦｃγＲと表記する）および各種補体成分との結合が必要であり、その結合については、抗体のヒンジ領域およびＣ領域の第２番目のドメイン（以下、ＣＨ２ドメインと表記する）内のいくつかのアミノ酸残基の重要性［ヨーロピアン・ジャーナル・オブ・イムノロジー（Ｅｕｒ．Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．），２３，１０９８（１９９３）、イムノロジー（Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ），８６，３１９（１９９５）、ケミカル・イムノロジー（Ｃｈｅｍｉｃａｌ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ），６５，８８（１９９７）］の他、ＣＨ２ドメインに結合している糖鎖の重要性［ケミカル・イムノロジー（Ｃｈｅｍｉｃａｌ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ），６５，８８（１９９７）］が示唆されている。

糖鎖に関しては、ボイド（Ｂｏｙｄ）らは、チャイニーズハムスター卵巣細胞（以下、ＣＨＯ細胞と表記する）或いはマウスミエローマＮＳＯ細胞（以下、ＮＳＯ細胞と表記する）で生産したヒト型ＣＤＲ移植抗体ＣＡＭＰＡＴＨ－１Ｈ（ヒトＩｇＧ１サブクラス）を各種糖分解酵素で処理し、糖鎖のＡＤＣＣ活性、ＣＤＣ活性に対する影響を検討した結果、非還元末端のシアル酸の除去は、両活性に影響を与えないが、更にガラクトース残基を除去することでＣＤＣ活性のみが影響を受け、約５０％程度活性が低下すること、糖鎖の完全な除去は、両活性を消失させることを報告した［モレキュラー・イムノロジー（Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｉｍｍｕｎｏｌ．），３２，１３１１（１９９５）］。また、ライフリー（Ｌｉｆｅｌｙ）らは、ＣＨＯ細胞、ＮＳＯ細胞或いはラットミエローマＹ０細胞（以下、Ｙ０細胞と表記する）で生産したヒト型ＣＤＲ移植抗体ＣＡＭＰＡＴＨ－１Ｈ（ヒトＩｇＧ１サブクラス）の糖鎖の分析およびＡＤＣＣ活性を測定した結果、Ｙ０細胞由来のＣＡＭＰＡＴＨ－１Ｈが最も高いＡＤＣＣ活性を示し、その活性にはバイセクティングに位置するＮ－アセチルグルコサミン（以下、ＧｌｃＮＡｃとも表記する）が重要であることを示唆した［グリコバイオロジー（Ｇｌｙｃｏｂｉｏｌｏｇｙ），５，８１３（１９９５）：ＷＯ９９／５４３４２］。これらの報告は、ヒトＩｇＧ１サブクラスの抗体のエフ

ェクター機能に糖鎖の構造が極めて重要な役割を果たしており、糖鎖の構造を変えることでより高いエフェクター機能を有する抗体を作製することが可能であることを示している。しかし、実際には糖鎖の構造は多様かつ複雑であり、エフェクター機能に真に重要な構造を特定できたとは言い難い。

以上のように、ＩｇＧクラスの抗体のＣＨ２ドメインに結合している糖鎖は、抗体のエフェクター機能の発現に大きな影響を与える。先にも述べたように、抗体のエフェクター機能のいくつかは、エフェクター細胞表面上に存在するＦｃγＲとの相互作用を介して発揮される［アニュアル・レビュー・オブ・イムノロジー（Ａｎｎｕ．Ｒｅｖ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．），１８，７０９（２０００）、アニュアル・レビュー・オブ・イムノロジー（Ａｎｎｕ．Ｒｅｖ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．），１９，２７５（２００１）］。

ＦｃγＲは、３つの異なるクラスが存在することが明らかとなっており、それぞれＦｃγＲＩ（ＣＤ６４）、ＦｃγＲＩＩ（ＣＤ３２）、ＦｃγＲＩＩＩ（ＣＤ１６）と呼ばれている。ヒトにおいては、ＦｃγＲＩＩとＦｃγＲＩＩＩは、さらに、ＦｃγＲＩＩａ、ＦｃγＲＩＩｂとＦｃγＲＩＩＩａ、ＦｃγＲＩＩＩｂに分類される。ＦｃγＲは、イムノグロブリンスーパーファミリーに属する膜蛋白質であり、ＦｃγＲＩＩとＦｃγＲＩＩＩは、２つのイムノグロブリン様ドメイン、ＦｃγＲＩは、３つのイムノグロブリン様ドメインからなる細胞外領域を持つα鎖を構成成分として持ち、α鎖がＩｇＧ結合活性を担っている。さらに、ＦｃγＲＩとＦｃγＲＩＩＩは、α鎖と会合してシグナル伝達機能を有するγ鎖あるいはζ鎖を構成成分として有している［アニュアル・レビュー・オブ・イムノロジー（Ａｎｎｕ．Ｒｅｖ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．），１８，７０９（２０００）、アニュアル・レビュー・オブ・イムノロジー（Ａｎｎｕ．Ｒｅｖ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．），１９，２７５（２００１）］。

ＦｃγＲＩは、10^{8}～10^{9} M^{-1}の結合定数（以下、K_Aと表記する）を持つ高親和性受容体であり、単量体のＩｇＧに対しても高い結合活性を有している［アナルズ・オブ・ヘマトロジー（Ａｎｎ．Ｈｅｍａｔｏｌ．），７６，２３１（１９９８）］。一方、ＦｃγＲＩＩとＦｃγＲＩＩＩは、単量体のＩｇＧに対しては、10^{5}～10^{7} M^{-1}の低いK_Aを示す低親和性受容体であり、抗原などと結合して多量体化したＩｇＧ免疫複合体と効率的に結合する［アナルズ・オブ・ヘマトロジー（Ａｎｎ．Ｈｅｍａｔｏｌ．），７６，２３１（１９９８）］。ＦｃγＲは、その機能から、活性化受容体と抑制性受容体に分けられる［アニュアル・レビュー・オブ・イムノロジー（Ａｎｎｕ．Ｒｅｖ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．），１９，２７５（２００１）］。

活性化受容体は、α鎖あるいは会合するγ鎖、ζ鎖の細胞内領域にｉｍｍｕｎｏｒｅｃｅｐｔｏｒ ｔｙｒｏｓｉｎｅ－ｂａｓｅｄ ａｃｔｉｖａｔｉｏｎ ｍｏｔｉｆ（以下、ＩＴＡＭと表記する）と呼ばれる１９アミノ酸残基からなる配列が存在する。ＩｇＧ免疫複合体の結合に伴ってＩＴＡＭと相互作用するＳｒｃやＳｙｋなどのチロシンキナーゼが活性化して、種々の活性化反応が惹起される。

抑制性受容体は、α鎖の細胞内領域にｉｍｍｕｎｏｒｅｃｅｐｔｏｒ ｔｙｒｏｓｉｎｅ－ｂａｓｅｄ ｉｎｈｉｂｉｔｏｒｙ ｍｏｔｉｆ（以下、ＩＴＩＭと表記する）と呼ばれる１３アミノ酸残基からなる配列が存在する。活性化受容体との会合を介してＩＴＩＭがリン酸化されることにより、ＳＨＩＰと呼ばれるホスファターゼの活性化を始めとして種々の反応が惹起され、活性化受容体からの活性化シグナルを抑制する。

ヒトでは、高親和性のＦｃγＲＩおよび低親和性のＦｃγＲＩＩａ、ＦｃγＲＩＩＩａは、活性化受容体として機能している。ＦｃγＲＩは、会合しているγ鎖の細胞内領域にＩＴＡＭ配列が存在している。ＦｃγＲＩは、マクロファージ、単球、樹状細胞、好中球、好酸球などに発現している。ＦｃγＲＩＩａは、単一のα鎖からなり、細胞内領域にＩＴＡＭ様配列が存在している。ＦｃγＲＩＩａは、マクロファージ、マスト細胞、単球、樹状細胞、ランゲルハンス細胞、好中球、好酸球、血小板および一部のＢ細胞に発現している。ＦｃγＲＩＩＩａは、会合しているγ鎖あるいはζ鎖の細胞内領域にＩＴＡＭ配列が存在し、ＮＫ細胞、マクロファージ、単球、マスト細胞、樹状細胞、ランゲルハンス細胞、好酸球などに発現しているが、好中球、Ｂ細胞およびＴ細胞には発現していない。

一方、低親和性受容体のＦｃγＲＩＩｂは、単一のα鎖からなり、細胞外領域のアミノ酸配列においてＦｃγＲＩＩａと約９０％の相同性を有する。しかしながら、細胞内領域にＩＴＩＭ配列が存在し、抑制性受容体として機能している。ＦｃγＲＩＩｂは、Ｂ細胞、マクロファージ、マスト細胞、単球、樹状細胞、ランゲルハンス細胞、好塩基球、好中球、好酸球に発現しているが、ＮＫ細胞やＴ細胞には発現していない。ＦｃγＲＩＩＩｂは、単一のα鎖からなり、細胞外領域のアミノ酸配列においてＦｃγＲＩＩＩａと約９５％の相同性を有する。しかしながら、グリコシルホスファチジルイノシトール（以下、ＧＰＩと表記する）結合型の膜蛋白質として、好中球に特異的に発現している。ＦｃγＲＩＩＩｂは、ＩｇＧ免疫複合体を結合するが、単独では細胞を活性化できず、ＦｃγＲＩＩａなどのＩＴＡＭ配列を有する受容体との会合を介して機能していると考えられている。このように、生体内におけるＩｇＧクラスの抗体のエフェクター機能は、様々なエフェクター細胞上に発現している活性化および抑制性のＦｃγＲとの複雑な相互作用の結果、発揮されている。

ＩｇＧクラスの抗体のエフェクター機能の１つであるＡＤＣＣ活性は、ＮＫ細胞、好中球、単球、マクロファージなどのエフェクター細胞の活性化の結果、生じると考えられており、中でもＮＫ細胞が、主要な役割を果たしている［ブラッド（Ｂｌｏｏｄ），７６，２４２１（１９９０）、トレンズ・イン・イムノロジー（Ｔｒｅｎｄｓ　ｉｎ　Ｉｍｍｕｎｏｌ．），２２，６３３（２００１）、インターナショナル・レビューズ・オブ・イムノロジー（Ｉｎｔ．Ｒｅｖ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．），２０，５０３（２００１）］。

ＮＫ細胞上に発現しているＦｃγＲは、ＦｃγＲＩＩＩａである。したがって、ＮＫ細胞に発現しているＦｃγＲＩＩＩａからの活性化シグナルを増強させることにより、ＡＤＣＣ活性を高めることができると考えられている。

Ｆｃ融合蛋白質としては、Ｅｔａｎｅｒｃｅｐｔ（商品名Ｅｎｂｒｅｌ、Ｉｍｍｕｎｅｘ社製）（ＵＳＰ　５，６０５，６９０）、Ａｌｅｆａｃｅｐｔ（商品名Ａｍｅｖｉｖｅ、Ｂｉｏｇｅｎ社製）（ＵＳＰ　５，９１４，１１１）などが知られている。また、抗体のＣＨ２ドメインが存在しなければＡＤＣＣ活性を有しないことが知られている（Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．，１５２，２７５３（１９９４））。

発明の開示

本発明は、以下の（１）～（４８）に関する。

（１）　抗体分子のＦｃ領域に結合するＮ－グリコシド結合複合型糖鎖を修飾することを含む、抗体組成物のＦｃγ受容体ＩＩＩａに対する結合活性を高める方法。

（２）　抗体分子のＦｃ領域に結合するＮ－グリコシド結合複合型糖鎖の修飾が、Ｎ－グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のＮ－アセチルグルコサミンの６位にフコースの１位がα結合していない糖鎖を抗体分子のＦｃ領域に結合させることである、（１）に記載の方法。

（３）　糖鎖が、Ｎ－グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のＮ－アセチルグルコサミンにフコースを結合する糖鎖の修飾に関与する蛋白質の活性が低下または欠失した細胞が合成する糖鎖であることを特徴とする、（１または２）に記載の方法。

（４）　Ｎ－グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のＮ－アセチルグルコサミンにフコースを結合する糖鎖の修飾に関与する蛋白質が、以下の（ａ）、（ｂ）および（ｃ）からなる群から選ばれる蛋白質である、（３）に記載の方法。

（ａ）細胞内糖ヌクレオチドＧＤＰ－フコースの合成に関与する蛋白質；

（ｂ）Ｎ－グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のＮ－アセチルグルコサミンの６位にフコースの１位がα結合する糖鎖修飾に関与する蛋白質；

（ｃ）細胞内糖ヌクレオチドＧＤＰ－フコースのゴルジ体への輸送に関与する蛋白質。

（５）　細胞が、Ｎ－グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のＮ－アセチルグルコサミンの６位にフコースの１位がα結合した糖鎖構造を認識するレクチンに耐性を有する細胞である、（３）または（４）に記載の方法。

（６）　細胞が、少なくとも、以下の（ａ）、（ｂ）、（ｃ）および（ｄ）からなる群から選ばれるレクチンの一つに耐性である、（３）～（５）のいずれか１項に記載の方法。

（ａ）レンズマメレクチン；
（ｂ）エンドウマメレクチン；
（ｃ）ソラマメレクチン；
（ｄ）ヒイロチャワンタケレクチン。
（７）　細胞が、酵母、動物細胞、昆虫細胞および植物細胞からなる群から選ばれる細胞である、（３～６のいずれか１項に記載の方法。
（８）　細胞が、以下の（ａ）～（ｉ）からなる群から選ばれる細胞である、（３）～（７）のいずれか１項に記載の方法。
（ａ）チャイニーズハムスター卵巣組織由来ＣＨＯ細胞；
（ｂ）ラットミエローマ細胞株ＹＢ２／３ＨＬ．Ｐ２．Ｇ１１．１６Ａｇ．２０細胞；
（ｃ）シリアンハムスター腎臓組織由来ＢＨＫ細胞；
（ｄ）マウスミエローマ細胞株ＮＳＯ細胞
（ｅ）マウスミエローマ細胞株ＳＰ２／０－Ａｇ１４細胞
（ｆ）ハイブリドーマ細胞；
（ｇ）ヒト白血病細胞株ナマルバ細胞；
（ｈ）胚性幹細胞；
（ｉ）受精卵細胞。
（９）　抗体分子が、以下の（ａ）、（ｂ）、（ｃ）および（ｄ）からなる群から選ばれる抗体分子である、（１）～（８）のいずれか１項に記載の方法。
（ａ）ヒト抗体；
（ｂ）ヒト化抗体；
（ｃ）（ａ）または（ｂ）のＦｃ領域を含む抗体の断片；
（ｄ）（ａ）または（ｂ）のＦｃ領域を有する融合蛋白質。
（１０）　抗体分子のクラスがＩｇＧである、（１）～（９）のいずれか１項に記載の方法。
（１１）　抗体分子のＦｃ領域に結合するＮ－グリコシド結合複合型糖鎖において、全Ｎ－グリコシド結合複合型糖鎖のうち、糖鎖還元末端のＮ－アセチルグルコサミンの６位にフコースの１位がα結合していない糖鎖の割合が２０％以上である、（１）～（１０）のいずれか１項に記載の方法。
（１２）　（１）～（１１）のいずれか１項に記載の方法により、抗体組成物の抗体依存性細胞障害活性を高める方法。
（１３）　抗体分子のＦｃ領域に結合するＮ－グリコシド結合複合型糖鎖を修飾することを含む、抗体組成物のＦｃγ受容体ＩＩＩａに対する結合活性が高められた抗体組成物を製造する方法。
（１４）　抗体分子のＦｃ領域に結合するＮ－グリコシド結合複合型糖鎖の修飾が、Ｎ－グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のＮ－アセチルグルコサミンの６位にフコースの１位がα結合していない糖鎖を抗体分子のＦｃ領域に結合させることである、（１３）に記載の方法。
（１５）　糖鎖が、Ｎ－グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のＮ－アセチルグルコサミンにフコースを結合する糖鎖の修飾に関与する蛋白質の活性が低下または欠失した細胞が合成する糖鎖であることを特徴とする、（１３）または（１４）に記載の方法。
（１６）　Ｎ－グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のＮ－アセチルグルコサミンにフコースを結合する糖鎖の修飾に関与する蛋白質が、以下の（ａ）、（ｂ）および（ｃ）からなる群から選ばれる蛋白質である、（１５）に記載の方法。
（ａ）細胞内糖ヌクレオチドＧＤＰ－フコースの合成に関与する蛋白質；
（ｂ）Ｎ－グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のＮ－アセチルグルコサミンの６位にフコースの１位がα結合する糖鎖修飾に関与する蛋白質；
（ｃ）細胞内糖ヌクレオチドＧＤＰ－フコースのゴルジ体への輸送に関与する蛋白質。
（１７）　細胞が、Ｎ－グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のＮ－アセチルグルコサミンの６位にフコースの１位がα結合した糖鎖構造を認識するレクチンに耐性を有する細胞で

ある、（１５）または（１６）に記載の方法。
（１８） 細胞が、少なくとも、以下の（ａ）、（ｂ）、（ｃ）および（ｄ）からなる群から選ばれるレクチンの一つに耐性である、（１５）～（１７）のいずれか１項に記載の方法。
（ａ）レンズマメレクチン；
（ｂ）エンドウマメレクチン；
（ｃ）ソラマメレクチン；
（ｄ）ヒイロチャワンタケレクチン。
（１９） 細胞が、酵母、動物細胞、昆虫細胞および植物細胞からなる群から選ばれる細胞である、（１５）～（１８）のいずれか１項に記載の方法。
（２０） 細胞が、以下の（ａ）～（ｉ）からなる群から選ばれる細胞である、（１５）～（１９）のいずれか１項に記載の方法。
（ａ）チャイニーズハムスター卵巣組織由来ＣＨＯ細胞；
（ｂ）ラットミエローマ細胞株ＹＢ２／３ＨＬ．Ｐ２．Ｇ１１．１６Ａｇ．２０細胞；
（ｃ）シリアンハムスター腎臓組織由来ＢＨＫ細胞；
（ｄ）マウスミエローマ細胞株ＮＳＯ細胞
（ｅ）マウスミエローマ細胞株ＳＰ２／０－Ａｇ１４細胞
（ｆ）ハイブリドーマ細胞；
（ｇ）ヒト白血病細胞株ナマルバ細胞；
（ｈ）胚性幹細胞；
（ｉ）受精卵細胞。
（２１） 抗体分子が、以下の（ａ）、（ｂ）、（ｃ）および（ｄ）からなる群から選ばれる抗体分子である、（１３）～（２０）のいずれか１項に記載の方法。
（ａ）ヒト抗体；
（ｂ）ヒト化抗体；
（ｃ）（ａ）または（ｂ）のＦｃ領域を含む抗体の断片；
（ｄ）（ａ）または（ｂ）のＦｃ領域を有する融合蛋白質。
（２２） 抗体分子のクラスがＩｇＧである、（１３～２１のいずれか１項に記載の方法。
（２３） 抗体分子のＦｃ領域に結合するＮ－グリコシド結合複合型糖鎖において、全Ｎ－グリコシド結合複合型糖鎖のうち、糖鎖還元末端のＮ－アセチルグルコサミンの６位にフコースの１位がα結合していない糖鎖の割合が２０％以上である、（１３）～（２２）のいずれか１項に記載の方法。
（２４） （１２）の方法を含む、抗体依存性細胞障害活性が高い抗体組成物を製造する方法。
（２５） （１３）～（２４）のいずれか１項に記載の製造方法により製造される抗体組成物。
（２６） 抗原と被験抗体組成物とを反応させて抗原と抗体組成物の複合体を形成し、該複合体をＦｃγ受容体ＩＩＩａと接触させてＦｃγ受容体ＩＩＩａに対する結合活性を測定し、スタンダードの抗体組成物中の糖鎖の割合とＦｃγ受容体ＩＩＩａに対する結合活性を示す検量線と比較することにより、抗体組成物中に含まれるＦｃ領域に結合する全Ｎ－グリコシド結合複合型糖鎖のうち、糖鎖還元末端のＮ－アセチルグルコサミンにフコースが結合していない糖鎖の割合を検出する方法。
（２７） 抗原と被験抗体組成物とを反応させたて抗原と抗体組成物の複合体を形成し、該複合体をＦｃγ受容体ＩＩＩａと接触させ、Ｆｃγ受容体ＩＩＩａに対する結合活性を測定し、スタンダードの抗体組成物の抗体依存性細胞障害活性とＦｃγ受容体ＩＩＩａに対する結合活性を示す検量線と比較することにより、抗体組成物の抗体依存性細胞障害活性を検出する方法。
（２８） 被験抗体組成物とＦｃγ受容体ＩＩＩａとを接触させ、抗体組成物とＦｃγ受容体ＩＩＩａとの結合活性を測定し、スタンダードの抗体組成物中の糖鎖の割合とＦｃγ

受容体ＩＩＩａとの結合活性を示す検量線と比較することにより、抗体組成物中に含まれるＦｃ領域に結合する全Ｎ－グリコシド結合複合型糖鎖のうち、糖鎖還元末端のＮ－アセチルグルコサミンにフコースが結合していない糖鎖の割合を検出する方法。

（２９）　被験抗体組成物とＦｃγ受容体ＩＩＩａとを接触させ、抗体組成物とＦｃγ受容体ＩＩＩａとの結合活性を測定し、スタンダードの抗体組成物の抗体依存性細胞障害活性とＦｃγ受容体ＩＩＩａとの結合活性を示す検量線と比較することにより、抗体組成物の抗体依存性細胞障害活性を検出する方法。

（３０）　Ｎ－グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のＮ－アセチルグルコサミンの６位とフコースの１位がα結合した糖鎖構造を認識するレクチンに耐性を有する細胞を用いて製造されたＦｃ融合蛋白質組成物。

（３１）　細胞が、以下の（ａ）、（ｂ）および（ｃ）からなる群から選ばれる蛋白質の活性が低下または欠失した細胞である、（３０）に記載のＦｃ融合蛋白質組成物。

（ａ）細胞内糖ヌクレオチドＧＤＰ－フコースの合成に関与する酵素蛋白質；

（ｂ）Ｎ－グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のＮ－アセチルグルコサミンの６位にフコースの１位がα結合する糖鎖修飾に関与する酵素蛋白質；

（ｃ）細胞内糖ヌクレオチドＧＤＰ－フコースのゴルジ体への輸送に関与する蛋白質。

（３２）　細胞が、少なくとも、以下の（ａ）、（ｂ）、（ｃ）および（ｄ）からなる群から選ばれるレクチンの一つに耐性である、（３０）または（３１）記載のＦｃ融合蛋白質組成物。

（ａ）レンズマメレクチン；

（ｂ）エンドウマメレクチン；

（ｃ）ソラマメレクチン；

（ｄ）ヒイロチャワンタケレクチン。

（３３）　細胞が、Ｆｃ融合蛋白質をコードする遺伝子を導入した細胞である、（３０）～（３２）のいずれか１項に記載のＦｃ融合蛋白質組成物。

（３４）　Ｆｃが抗体分子のＩｇＧクラス由来である、（３３）に記載のＦｃ融合蛋白質組成物。

（３５）　細胞が、酵母、動物細胞、昆虫細胞および植物細胞からなる群から選ばれる細胞である、（３０）～（３４）のいずれか１項に記載のＦｃ融合蛋白質組成物。

（３６）　細胞が、マウスミエローマ細胞である、（３０）～（３５）のいずれか１項に記載のＦｃ融合蛋白質組成物。

（３７）　マウスミエローマ細胞が、ＮＳＯ細胞またはＳＰ２／０－Ａｇ１４細胞である（３６）記載のＦｃ融合蛋白質組成物。

（３８）　細胞が、以下の（ａ）～（ｇ）からなる群から選ばれる細胞である、（３０）～（３７）のいずれか１項に記載のＦｃ融合蛋白質組成物。

（ａ）チャイニーズハムスター卵巣組織由来ＣＨＯ細胞；

（ｂ）ラットミエローマ細胞株ＹＢ２／３ＨＬ．Ｐ２．Ｇ１１．１６Ａｇ．２０細胞；

（ｃ）シリアンハムスター腎臓組織由来ＢＨＫ細胞；

（ｄ）抗体を生産するハイブリドーマ細胞；

（ｅ）ヒト白血病細胞株ナマルバ細胞；

（ｆ）胚性幹細胞；

（ｇ）受精卵細胞。

（３９）　Ｎ－グリコシド結合複合型糖鎖を抗体分子のＦｃ領域に有するＦｃ融合蛋白質からなる組成物であって、該組成物中に含まれるＦｃ領域に結合する全Ｎ－グリコシド結合複合型糖鎖のうち、糖鎖還元末端のＮ－アセチルグルコサミンにフコースが結合していない糖鎖の割合が２０％以上であるＦｃ融合蛋白質組成物。

（４０）　フコースが結合していない糖鎖が、該フコースの１位がＮ－グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のＮ－アセチルグルコサミンの６位にα結合していない糖鎖である、（３９）記載のＦｃ融合蛋白質組成物。

（４１）　抗体分子のクラスがＩｇＧである、（３９）または（４０）記載のＦｃ融合蛋

白質組成物。
（４２）　Ｆｃ融合蛋白質組成物が、Ｆｃ融合繊維芽細胞増殖因子－８である（３０）～（４１）のいずれか１項に記載のＦｃ融合蛋白質組成物。
（４３）　（３０）～（４２）のいずれか１項に記載のＦｃ融合蛋白質組成物を生産する細胞。
（４４）　細胞が、酵母、動物細胞、昆虫細胞および植物細胞からなる群から選ばれる、（４３）記載の細胞。
（４５）　細胞が、マウスミエローマ細胞である、（４３）または（４４）記載の細胞。
（４６）　マウスミエローマ細胞が、ＮＳＯ細胞またはＳＰ２／０－Ａｇ１４細胞である（４５）記載の細胞。
（４７）　細胞が、以下の（ａ）～（ｇ）からなる群から選ばれる細胞である、（４３）～（４６）のいずれか１項に記載の細胞。
（ａ）チャイニーズハムスター卵巣組織由来ＣＨＯ細胞；
（ｂ）ラットミエローマ細胞株ＹＢ２／３ＨＬ．Ｐ２．Ｇ１１．１６Ａｇ．２０細胞；
（ｃ）シリアンハムスター腎臓組織由来ＢＨＫ細胞；
（ｄ）抗体を生産するハイブリドーマ細胞；
（ｅ）ヒト白血病細胞株ナマルバ細胞；
（ｆ）胚性幹細胞；
（ｇ）受精卵細胞。
（４８）　（４３）～（４７）のいずれか１項に記載の細胞を培地に培養し、培養物中にＦｃ融合蛋白質組成物を生成蓄積させ、該培養物からＦｃ融合蛋白質組成物を採取する工程を含む、Ｆｃ融合蛋白質組成物の製造方法。
本発明は、抗体分子のＦｃ領域に結合するＮ－グリコシド結合複合型糖鎖を修飾することを含む、抗体組成物のＦｃγ受容体ＩＩＩａに対する結合活性を高める方法に関する。
本発明において、抗体分子とは、抗体のＦｃ領域を含む分子であればいかなる分子も包含される。具体的には、抗体、抗体の断片、Ｆｃ領域を有する融合蛋白質などをあげることができる。
抗体とは、外来抗原刺激の結果、免疫反応によって生体内に産生される蛋白質で、抗原と特異的に結合する活性を有するものをいう。抗体としては動物に抗原を免疫し、免疫動物の脾臓細胞より作製したハイブリドーマ細胞が分泌する抗体のほか、遺伝子組換え技術により作製された抗体、すなわち、抗体遺伝子を挿入した抗体発現ベクターを、宿主細胞へ導入することにより取得された抗体などがあげられる。具体的には、ハイブリドーマが生産する抗体、ヒト化抗体、ヒト抗体などをあげることができる。
ハイブリドーマとは、ヒト以外の哺乳動物に抗原を免疫して取得されたＢ細胞と、マウス等に由来するミエローマ細胞とを細胞融合させて得られる、所望の抗原特異性を有したモノクローナル抗体を産生する細胞を意味する。
ヒト化抗体としては、ヒト型キメラ抗体、ヒト型ＣＤＲ移植抗体などがあげられる。
ヒト型キメラ抗体は、ヒト以外の動物の抗体重鎖Ｖ領域（以下、重鎖はＨ鎖としてＨＶまたはＶＨとも表記する）および抗体軽鎖Ｖ領域（以下、軽鎖はＬ鎖としてＬＶまたはＶＬとも表記する）とヒト抗体のＨ鎖Ｃ領域（以下、ＣＨとも表記する）およびヒト抗体の軽鎖Ｃ領域（以下、ＣＬとも表記する）とからなる抗体を意味する。ヒト以外の動物としては、マウス、ラット、ハムスター、ウサギ等、ハイブリドーマを作製することが可能であれば、いかなるものも用いることができる。
ヒト型キメラ抗体は、モノクローナル抗体を生産するハイブリドーマより、ＶＨおよびＶＬをコードするｃＤＮＡを取得し、ヒト抗体ＣＨおよびヒト抗体ＣＬをコードする遺伝子を有する宿主細胞用発現ベクターにそれぞれ挿入してヒト型キメラ抗体発現ベクターを構築し、該発現ベクターを宿主細胞へ導入することにより発現させ、製造することができる。
ヒト型キメラ抗体のＣＨとしては、ヒトイムノグロブリン（以下、ｈＩｇと表記する）に属すればいかなるものでもよいが、ｈＩｇＧクラスのものが好適であり、更にｈＩｇＧク

ラスに属するｈＩｇＧ１、ｈＩｇＧ２、ｈＩｇＧ３、ｈＩｇＧ４といったサブクラスのいずれも用いることができる。また、ヒト型キメラ抗体のＣＬとしては、ｈＩｇに属すればいかなるものでもよく、κクラスあるいはλクラスのものを用いることができる。

ヒト型ＣＤＲ移植抗体は、ヒト以外の動物の抗体のＶＨおよびＶＬのＣＤＲのアミノ酸配列をヒト抗体のＶＨおよびＶＬの適切な位置に移植した抗体を意味する。

ヒト型ＣＤＲ移植抗体は、ヒト以外の動物の抗体のＶＨおよびＶＬのＣＤＲ配列を任意のヒト抗体のＶＨおよびＶＬのＣＤＲ配列に移植したＶ領域をコードするｃＤＮＡを構築し、ヒト抗体のＣＨおよびヒト抗体のＣＬをコードする遺伝子を有する宿主細胞用発現ベクターにそれぞれ挿入してヒト型ＣＤＲ移植抗体発現ベクターを構築し、該発現ベクターを宿主細胞へ導入することにより発現させ、製造することができる。

ヒト型ＣＤＲ移植抗体のＣＨとしては、ｈＩｇに属すればいかなるものでもよいが、ｈＩｇＧクラスのものが好適であり、更にｈＩｇＧクラスに属するｈＩｇＧ１、ｈＩｇＧ２、ｈＩｇＧ３、ｈＩｇＧ４といったサブクラスのいずれも用いることができる。また、ヒト型ＣＤＲ移植抗体のＣＬとしては、ｈＩｇに属すればいかなるものでもよく、κクラスあるいはλクラスのものを用いることができる。

ヒト抗体は、元来、ヒト体内に天然に存在する抗体を意味するが、最近の遺伝子工学的、細胞工学的、発生工学的な技術の進歩により作製されたヒト抗体ファージライブラリーならびにヒト抗体産生トランスジェニック非ヒト動物あるいはヒト抗体産生トランスジェニック植物から得られる抗体等も含まれる。

ヒト体内に存在する抗体は、例えば、ヒト末梢血リンパ球を単離し、ＥＢウイルス等を感染させ不死化、クローニングすることにより、ヒト抗体を産生するリンパ球を培養でき、培養物中よりヒト抗体を精製することができる。

ヒト抗体ファージライブラリーは、ヒトＢ細胞から調製した抗体遺伝子をファージ遺伝子に挿入することによりＦａｂ、一本鎖抗体等の抗体断片をファージ表面に発現させたライブラリーである。該ライブラリーより、抗原を固定化した基質に対する結合活性を指標として所望の抗原結合活性を有する抗体断片を発現しているファージを回収することができる。該抗体断片は、更に遺伝子工学的手法により、２本の完全なＨ鎖および２本の完全なＬ鎖からなるヒト抗体分子へも変換することができる。

ヒト抗体産生トランスジェニック非ヒト動物は、ヒト抗体遺伝子が細胞内に組込まれた動物を意味する。具体的には、マウスＥＳ細胞へヒト抗体遺伝子を導入し、該ＥＳ細胞を他のマウスの初期胚へ移植後、発生させることによりヒト抗体産生トランスジェニックマウスを作製することができる。また、動物の受精卵にヒト抗体遺伝子を導入し、該受精卵を発生させることによりヒト抗体産生トランスジェニック非ヒト動物を作製することもできる。ヒト抗体産生トランスジェニック非ヒト動物からのヒト抗体の作製方法は、通常のヒト以外の哺乳動物で行われているハイブリドーマ作製方法によりヒト抗体産生ハイブリドーマを得、培養することで培養物中にヒト抗体を産生蓄積させることができる。

トランスジェニック非ヒト動物としては、ウシ、ヒツジ、ヤギ、ブタ、ウマ、マウス、ラット、ニワトリ、サルまたはウサギ等があげられる。

また、本発明において、抗体が、腫瘍関連抗原を認識する抗体、アレルギーあるいは炎症に関連する抗原を認識する抗体、循環器疾患に関連する抗原を認識する抗体、自己免疫疾患に関連する抗原を認識する抗体、またはウイルスあるいは細菌感染に関連する抗原を認識する抗体であることが好ましく、抗体のクラスはＩｇＧであることが好ましい。

抗体の断片は、上記抗体の少なくともＦｃ領域の一部を含んだ断片をいう。Ｆｃ領域とは、抗体のＨ鎖のＣ末端側の領域、ＣＨ２領域およびＣＨ３領域を意味し、天然型およびその変異型を包含する。少なくともＦｃ領域の一部とは、好ましくはＣＨ２領域を含む断片、より好ましくはＣＨ２領域内に存在する１番目のアスパラギン酸を含む領域をいう。ＩｇＧクラスのＦｃ領域は、カバット（Ｋａｂａｔ）らのＥＵ Ｉｎｄｅｘ［シーケンシズ・オブ・プロテインズ・オブ・イムノロジカル・インタレスト（Ｓｅｑｕｅｎｃｅｓ ｏｆ Ｐｒｏｔｅｉｎｓ ｏｆ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｉｃａｌ Ｉｎｔｅｒｅｓｔ），５th Ｅｄ．Ｐｕｂｌｉｃ Ｈｅａｌｔｈ Ｓｅｒｖｉｃｅ，Ｎａｔｉｏｎａｌ Ｉｎｓｔ

ｉｔｕｔｅｓ ｏｆ Ｈｅａｌｔｈ，Ｂｅｔｈｅｓｄａ，ＭＤ．（１９９１）］のナンバリングで２２６番目のＣｙｓからＣ末端、あるいは２３０番目のＰｒｏからＣ末端までを意味する。抗体の断片としては、Ｈ鎖の単量体、Ｈ鎖の２量体などがあげられる。

Ｆｃ領域の一部を有する融合蛋白質とは、抗体のＦｃ領域の一部を含んだ抗体あるいは抗体の断片と、酵素、サイトカインなどの蛋白質とを融合させた物質（以下、Ｆｃ融合蛋白質と称す）を意味する。

本発明において、抗体分子のＦｃ領域に結合するＮ－グリコシド結合糖鎖としては、コア構造の非還元末端側にガラクトース－Ｎ－アセチルグルコサミン（以下、Ｇａｌ－ＧｌｃＮＡｃと表記する）の枝を並行して１ないしは複数本有し、更にＧａｌ－ＧｌｃＮＡｃの非還元末端側にシアル酸、バイセクティングのＮ－アセチルグルコサミンなどの構造を有する複合型をあげることができる。

抗体分子のＦｃ領域には、Ｎ－グリコシド結合糖鎖がそれぞれ１箇所ずつ結合する領域を有しているので、抗体１分子あたり２本の糖鎖が結合している。抗体に結合する２本のＮ－グリコシド結合糖鎖には多数の構造の糖鎖が存在することになるので、Ｆｃ領域に結合した糖鎖構造の観点から抗体分子の同一性を判断することができる。

抗体組成物とは、Ｎ－グリコシド結合複合型糖鎖をＦｃ領域に有する抗体分子からなる組成物であり、該組成物は、単一の糖鎖構造を有する抗体分子で構成されていてもよいし、複数の異なる糖鎖構造を有する抗体分子から構成されていてもよい。

抗体分子のＦｃ領域に結合するＮ－グリコシド結合複合型糖鎖の修飾は、Ｎ－グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のＮ－アセチルグルコサミンにフコースが結合していない糖鎖を抗体分子のＦｃ領域に結合させることが好ましい。

本発明において、Ｎ－グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のＮ－アセチルグルコサミンにフコースが結合していない糖鎖とは、フコースの１位が、Ｎ－グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のＮ－アセチルグルコサミンの６位にα結合していない糖鎖をいう。

該糖鎖は、Ｎ－グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のＮ－アセチルグルコサミンにフコースが結合していない糖鎖の修飾に関与する蛋白質の活性が低下または欠失した細胞により合成される。

本発明において、フコースの１位が、Ｎ－グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のＮ－アセチルグルコサミンの６位にα結合していない糖鎖の修飾に関与する酵素蛋白質としては、

（ａ）細胞内糖ヌクレオチドＧＤＰ－フコースの合成に関与する酵素蛋白質（以下、「ＧＤＰ－フコース合成酵素」と表記する）；

（ｂ）Ｎ－グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のＮ－アセチルグルコサミンの６位にフコースの１位がα結合する糖鎖修飾に関与する酵素蛋白質（以下、「α１，６－フコース修飾酵素」と表記する）；

（ｃ）細胞内糖ヌクレオチドＧＤＰ－フコースのゴルジ体への輸送に関与する蛋白質（以下、「ＧＤＰ－フコース輸送蛋白質」と表記する）などがあげられる。

本発明において、ＧＤＰ－フコース合成酵素とは、細胞内で糖鎖へのフコースの供給源である糖ヌクレオチドＧＤＰ－フコースの合成に関与する酵素であればいかなる酵素も包含し、細胞内糖ヌクレオチドＧＤＰ－フコースの合成に影響を与える酵素のことをいう。

細胞内の糖ヌクレオチドＧＤＰ－フコースは、ｄｅ ｎｏｖｏの合成経路あるいはＳａｌｖａｇｅ合成経路により供給されている。したがって、これら合成経路に関与する酵素はすべてＧＤＰ－フコース合成酵素に包含される。

ｄｅ ｎｏｖｏの合成経路に関与するＧＤＰ－フコース合成酵素としては、具体的には、ＧＤＰ－ｍａｎｎｏｓｅ ４－ｄｅｈｙｄｒａｔａｓｅ（ＧＤＰ－マンノース４－デヒドラターゼ；以下、ＧＭＤと表記する）、ＧＤＰ－ｋｅｔｏ－６－ｄｅｏｘｙｍａｎｎｏｓｅ ３，５－ｅｐｉｍｅｒａｓｅ，４－ｒｅｄｕｃｔａｓｅ（ＧＤＰ－ケト－デオキシマンノース３，５－エピメラーゼ，４－リダクターゼ；以下、Ｆｘと表記する）などがあげられる。

Ｓａｌｖａｇｅ合成経路に関与するＧＤＰ－フコース合成酵素としては、具体的には、ＧＤＰ－ｂｅｔａ－Ｌ－ｆｕｃｏｓｅ ｐｙｒｏｐｈｏｓｐｈｏｒｙｌａｓｅ（ＧＤＰ－ベ

ーター－Ｌ－フコース－ピロホスフォリラーゼ；以下、ＧＦＰＰと表記する）、Ｆｕｃｏｋｉｎａｓｅ（フコキナーゼ）などがあげられる。
細胞内糖ヌクレオチドＧＤＰ－フコースの合成に影響を与える酵素としては、上述の細胞内の糖ヌクレオチドＧＤＰ－フコースの合成経路に関与する酵素の活性に影響を与えたり、該酵素の基質となる物質の構造に影響を与える酵素も包含される。
ＧＭＤとしては、以下の（ａ）および（ｂ）からなる群から選ばれるＤＮＡがコードする蛋白質、以下の（ｃ）、（ｄ）および（ｅ）からなる群から選ばれる蛋白質などがあげられる。
（ａ）配列番号６５で表される塩基配列からなるＤＮＡ；
（ｂ）配列番号６５で表される塩基配列からなるＤＮＡとストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつＧＭＤ活性を有する蛋白質をコードするＤＮＡ；
（ｃ）配列番号７１で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質；
（ｄ）配列番号７１で表されるアミノ酸配列において、１以上のアミノ酸が欠失、置換、挿入および／または付加されたアミノ酸配列からなり、かつＧＭＤ活性を有する蛋白質；
（ｅ）配列番号７１で表されるアミノ酸配列と８０％以上の相同性を有するアミノ酸配列からなり、かつＧＭＤ活性を有する蛋白質。
Ｆｘとしては、以下の（ａ）および（ｂ）からなる群から選ばれるＤＮＡがコードする蛋白質、以下の（ｃ）、（ｄ）および（ｅ）からなる群から選ばれる蛋白質などがあげられる。
（ａ）配列番号４８で表される塩基配列からなるＤＮＡ；
（ｂ）配列番号４８で表される塩基配列からなるＤＮＡとストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつＦｘ活性を有する蛋白質をコードするＤＮＡ；
（ｃ）配列番号１９で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質；
（ｄ）配列番号１９で表されるアミノ酸配列において、１以上のアミノ酸が欠失、置換、挿入および／または付加されたアミノ酸配列からなり、かつＦｘ活性を有する蛋白質；
（ｅ）配列番号１９で表されるアミノ酸配列と８０％以上の相同性を有するアミノ酸配列からなり、かつＦｘ活性を有する蛋白質。
ＧＦＰＰとしては、以下の（ａ）および（ｂ）からなる群から選ばれるＤＮＡがコードする蛋白質、以下の（ｃ）、（ｄ）および（ｅ）からなる群から選ばれる蛋白質などがあげられる。
（ａ）配列番号５１で表される塩基配列からなるＤＮＡ；
（ｂ）配列番号５１で表される塩基配列からなるＤＮＡとストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつＧＦＰＰ活性を有する蛋白質をコードするＤＮＡ；
（ｃ）配列番号２０で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質；
（ｄ）配列番号２０で表されるアミノ酸配列において、１以上のアミノ酸が欠失、置換、挿入および／または付加されたアミノ酸配列からなり、かつＧＦＰＰ活性を有する蛋白質；
（ｅ）配列番号２０で表されるアミノ酸配列と８０％以上の相同性を有するアミノ酸配列からなり、かつＧＦＰＰ活性を有する蛋白質。
本発明において、α１，６－フコース修飾酵素とは、Ｎ－グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のＮ－アセチルグルコサミンの６位とフコースの１位がα結合する反応に関与する酵素であればいかなる酵素も包含される。Ｎ－グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のＮ－アセチルグルコサミンの６位とフコースの１位がα結合する反応に関与する酵素とは、Ｎ－グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のＮ－アセチルグルコサミンの６位とフコースの１位がα結合する反応に影響を与える酵素を意味する。
α１，６－フコース修飾酵素としては、具体的には、α１，６－フコシルトランスフェラーゼやα－Ｌ－フコシダーゼなどがあげられる。
また、上述のＮ－グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のＮ－アセチルグルコサミンの６位とフコースの１位がα結合する反応に関与する酵素の活性に影響を与えたり、該酵素の基質となる物質の構造に影響を与える酵素も包含される。

α１，６－フコシルトランスフェラーゼとしては、以下の（ａ）、（ｂ）、（ｃ）および（ｄ）からなる群から選ばれるＤＮＡがコードする蛋白質、以下の（ｅ）、（ｆ）、（ｇ）、（ｈ）、（ｉ）および（ｊ）からなる群から選ばれる蛋白質などがあげられる。
（ａ）配列番号１で表される塩基配列からなるＤＮＡ；
（ｂ）配列番号２で表される塩基配列からなるＤＮＡ；
（ｃ）配列番号１で表される塩基配列からなるＤＮＡとストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつα１，６－フコシルトランスフェラーゼ活性を有する蛋白質をコードするＤＮＡ；
（ｄ）配列番号２で表される塩基配列からなるＤＮＡとストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつα１，６－フコシルトランスフェラーゼ活性を有する蛋白質をコードするＤＮＡ；
（ｅ）配列番号２３で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質；
（ｆ）配列番号２４で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質；
（ｇ）配列番号２３で表されるアミノ酸配列において、１以上のアミノ酸が欠失、置換、挿入および／または付加されたアミノ酸配列からなり、かつα１，６－フコシルトランスフェラーゼ活性を有する蛋白質；
（ｈ）配列番号２４で表されるアミノ酸配列において、１以上のアミノ酸が欠失、置換、挿入および／または付加されたアミノ酸配列からなり、かつα１，６－フコシルトランスフェラーゼ活性を有する蛋白質；
（ｉ）配列番号２３で表されるアミノ酸配列と８０％以上の相同性を有するアミノ酸配列からなり、かつα１，６－フコシルトランスフェラーゼ活性を有する蛋白質；
（ｊ）配列番号２４で表されるアミノ酸配列と８０％以上の相同性を有するアミノ酸配列からなり、かつα１，６－フコシルトランスフェラーゼ活性を有する蛋白質。
ＧＤＰ－フコース輸送蛋白質としては、細胞内糖ヌクレオチドＧＤＰ－フコースのゴルジ体への輸送に関与する蛋白質、または細胞内糖ヌクレオチドＧＤＰ－フコースをゴルジ体内へ輸送する反応に影響を与える蛋白質であればいかなる蛋白質も包含される。
ＧＤＰ－フコース輸送蛋白質としては、具体的には、ＧＤＰ－フコーストランスポーターなどがあげられる。
また、細胞内糖ヌクレオチドＧＤＰ－フコースをゴルジ体内へ輸送する反応に影響を与える蛋白質としては、上述のＧＤＰ－フコース輸送蛋白質の活性に影響を与えたり、発現に影響を与える蛋白質も包含される。
本発明のＧＤＰ－フコーストランスポーターとしては、以下の（ａ）～（ｈ）からなる群から選ばれるＤＮＡがコードする蛋白質があげられる。
（ａ）配列番号９１で表される塩基配列からなるＤＮＡ；
（ｂ）配列番号９３で表される塩基配列からなるＤＮＡ；
（ｃ）配列番号９５で表される塩基配列からなるＤＮＡ；
（ｄ）配列番号９７で表される塩基配列からなるＤＮＡ；
（ｅ）配列番号９１で表される塩基配列からなるＤＮＡとストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつＧＤＰ－フコーストランスポーター活性を有する蛋白質をコードするＤＮＡ；
（ｆ）配列番号９３で表される塩基配列からなるＤＮＡとストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつＧＤＰ－フコーストランスポーター活性を有する蛋白質をコードするＤＮＡ；
（ｇ）配列番号９５で表される塩基配列からなるＤＮＡとストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつＧＤＰ－フコーストランスポーター活性を有する蛋白質をコードするＤＮＡ；
（ｈ）配列番号９７で表される塩基配列からなるＤＮＡとストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつＧＤＰ－フコーストランスポーター活性を有する蛋白質をコードするＤＮＡ。
さらに、本発明のＧＤＰ－フコーストランスポーターとしては、以下の（ｉ）～（ｔ）か

らなる群から選ばれる蛋白質があげられる。
（ｉ）配列番号９２で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質；
（ｊ）配列番号９４で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質；
（ｋ）配列番号９６で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質；
（ｌ）配列番号９８で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質；
（ｍ）配列番号９２で表されるアミノ酸配列において、１以上のアミノ酸が欠失、置換、挿入および／または付加されたアミノ酸配列からなり、かつＧＤＰ－フコーストランスポーター活性を有する蛋白質；
（ｎ）配列番号９４で表されるアミノ酸配列において、１以上のアミノ酸が欠失、置換、挿入および／または付加されたアミノ酸配列からなり、かつＧＤＰ－フコーストランスポーター活性を有する蛋白質；
（ｏ）配列番号９６で表されるアミノ酸配列において、１以上のアミノ酸が欠失、置換、挿入および／または付加されたアミノ酸配列からなり、かつＧＤＰ－フコーストランスポーター活性を有する蛋白質；
（ｐ）配列番号９８で表されるアミノ酸配列において、１以上のアミノ酸が欠失、置換、挿入および／または付加されたアミノ酸配列からなり、かつＧＤＰ－フコーストランスポーター活性を有する蛋白質；
（ｑ）配列番号９２で表されるアミノ酸配列と８０％以上の相同性を有するアミノ酸配列からなり、かつＧＤＰ－フコーストランスポーター活性を有する蛋白質；
（ｒ）配列番号９４で表されるアミノ酸配列と８０％以上の相同性を有するアミノ酸配列からなり、かつＧＤＰ－フコーストランスポーター活性を有する蛋白質；
（ｓ）配列番号９６で表されるアミノ酸配列と８０％以上の相同性を有するアミノ酸配列からなり、かつＧＤＰ－フコーストランスポーター活性を有する蛋白質；
（ｔ）配列番号９８で表されるアミノ酸配列と８０％以上の相同性を有するアミノ酸配列からなり、かつＧＤＰ－フコーストランスポーター活性を有する蛋白質。
ストリンジェントな条件下でハイブリダイズするＤＮＡとは、例えば配列番号１、２、４８、５１、６５、９１、９３、９５または９７で表される塩基配列を有するＤＮＡなどのＤＮＡまたはその一部の断片をプローブとして、コロニー・ハイブリダイゼーション法、プラーク・ハイブリダイゼーション法あるいはサザンブロットハイブリダイゼーション法等を用いることにより得られるＤＮＡを意味し、具体的には、コロニーあるいはプラーク由来のＤＮＡを固定化したフィルターを用いて、０．７～１．０ｍｏｌ／Ｌの塩化ナトリウム存在下、６５℃でハイブリダイゼーションを行った後、０．１～２倍濃度のＳＳＣ溶液（１倍濃度のＳＳＣ溶液の組成は、１５０ｍｍｏｌ／Ｌ塩化ナトリウム、１５ｍｍｏｌ／Ｌクエン酸ナトリウムよりなる）を用い、６５℃条件下でフィルターを洗浄することにより同定できるＤＮＡをあげることができる。ハイブリダイゼーションは、Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ，Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ，Ｓｅｃｏｎｄ Ｅｄｉｔｉｏｎ，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｐｒｅｓｓ，１９８９（以下、モレキュラー・クローニング第２版と略す）、Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ，Ｊｏｈｎ Ｗｉｌｅｙ ＆ Ｓｏｎｓ，１９８７－１９９７（以下、カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジーと略す）、ＤＮＡ Ｃｌｏｎｉｎｇ １：Ｃｏｒｅ Ｔｅｃｈｎｉｑｕｅｓ，Ａ Ｐｒａｃｔｉｃａｌ Ａｐｐｒｏａｃｈ，Ｓｅｃｏｎｄ Ｅｄｉｔｉｏｎ，Ｏｘｆｏｒｄ Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ（１９９５）等に記載されている方法に準じて行うことができる。ハイブリダイズ可能なＤＮＡとして具体的には、配列番号１、２、４８、５１、６５、９１、９３、９５または９７で表される塩基配列と少なくとも６０％以上の相同性を有するＤＮＡ、好ましくは７０％以上、より好ましくは８０％以上、さらに好ましくは９０％以上、特に好ましくは９５％以上、最も好ましくは９８％以上の相同性を有するＤＮＡをあげることができる。
配列番号１９、２０、２３、２４、７１、９２、９４、９６または９８で表されるアミノ酸配列において１以上のアミノ酸が欠失、置換、挿入および／または付加されたアミノ酸

配列からなり、かつα１，６－フコシルトランスフェラーゼ活性、ＧＭＤ活性、Ｆｘ活性、ＧＦＰＰ活性またはＧＤＰ－フコーストランスポーター活性を有する蛋白質は、モレキュラー・クローニング第２版、カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー、Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓｅａｒｃｈ，１０，６４８７（１９８２）、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．，ＵＳＡ，７９，６４０９（１９８２）、Ｇｅｎｅ，３４，３１５（１９８５）、Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓｅａｒｃｈ，１３，４４３１（１９８５）、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ ＵＳＡ，８２，４８８（１９８５）等に記載の部位特異的変異導入法を用いて、例えば、配列番号１、２、４８、５１または６５で表されるアミノ酸配列を有する蛋白質をコードするＤＮＡに部位特異的変異を導入することにより取得することができる。欠失、置換、挿入および／または付加されるアミノ酸の数は１個以上でありその数は特に限定されないが、上記の部位特異的変異導入法等の周知の技術により、欠失、置換もしくは付加できる程度の数であり、例えば、１～数十個、好ましくは１～２０個、より好ましくは１～１０個、さらに好ましくは１～５個である。

また、用いられる蛋白質が、α１，６－フコシルトランスフェラーゼ活性、ＧＭＤ活性、Ｆｘ活性、ＧＦＰＰ活性またはＧＤＰ－フコーストランスポーター活性を有するためには、それぞれ配列番号１９、２０、２３、２４、７１、９２、９４、９６または９８で表されるアミノ酸配列とＢＬＡＳＴ［ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー（Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．），２１５，４０３（１９９０）］やＦＡＳＴＡ［メソッズ・イン・エンザイモロジー（Ｍｅｔｈｏｄｓ ｉｎ Ｅｎｚｙｍｏｌｏｇｙ），１８３，６３（１９９０）］等の解析ソフトを用いて計算したときに、少なくとも８０％以上、好ましくは８５％以上、より好ましくは９０％以上、さらに好ましくは９５％以上、特に好ましくは９７％以上、最も好ましくは９９％以上の相同性を有する。

上述の細胞を取得する方法としては、目的とする酵素活性を低下または欠失させることができる手法であれば、いずれの手法でも用いることができる。上述の酵素活性を低下または欠失させる手法としては、

（ａ）酵素の遺伝子を標的した遺伝子破壊の手法；

（ｂ）酵素の遺伝子のドミナントネガティブ体を導入する手法；

（ｃ）酵素についての突然変異を導入する手法；

（ｄ）酵素の遺伝子の転写または翻訳を抑制する手法；などがあげられる。

また、Ｎ－グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のＮ－アセチルグルコサミンの６位とフコースの１位がα結合した糖鎖構造を認識するレクチンに耐性を有する細胞を選択する方法もあげられる。

レクチン耐性を有する細胞は、細胞培養時に一定の有効濃度のレクチンが存在しても、生育が阻害されない。

本発明において、生育が阻害されないレクチンの有効濃度は、細胞株に応じて適宜定めればよいが、通常１０μｇ／ｍｌ～１０．０ｍｇ／ｍｌ、好ましくは０．５～２．０ｍｇ／ｍｌである。親株細胞に変異を導入した場合のレクチンの有効濃度とは、親株細胞が正常に生育できない濃度以上であり、好ましくは親株細胞が正常に生育できない濃度と同濃度、より好ましくは２～５倍、さらに好ましくは１０倍、最も好ましくは２０倍以上である。

Ｎ－グリコシド結合糖鎖還元末端のＮ－アセチルグルコサミンの６位とフコースの１位がα結合した糖鎖構造を認識するレクチンとしては、該糖鎖構造を認識できるレクチンであれば、いずれのレクチンでも用いることができる。その具体的な例としては、レンズマメレクチンＬＣＡ（Ｌｅｎｓ Ｃｕｌｉｎａｒｉｓ由来のＬｅｎｔｉｌ Ａｇｇｌｕｔｉｎｉｎ）、エンドウマメレクチンＰＳＡ（Ｐｉｓｕｍ ｓａｔｉｖｕｍ由来のＰｅａ Ｌｅｃｔｉｎ）、ソラマメレクチンＶＦＡ（Ｖｉｃｉａ ｆａｂａ由来のＡｇｇｌｕｔｉｎｉｎ）、ヒイロチャワンタケレクチンＡＡＬ（Ａｌｅｕｒｉａ ａｕｒａｎｔｉａ由来のＬｅｃｔｉｎ）等をあげることができる。

親株細胞とは、何らかの処理を施す前の細胞、すなわち本発明で用いるレクチンに耐性を

有する細胞を選択する工程を行う前の細胞、上述した酵素活性を低下または欠失するために遺伝子工学的な処理を行う前の細胞をいう。
親株細胞としては、特に限定はないが、具体例としては、以下の細胞があげられる。
ＮＳＯ細胞の親株細胞としては、バイオ／テクノロジー（ＢＩＯ／ＴＥＣＨＮＯＬＯＧＹ），１０，１６９（１９９２）、バイオテクノロジー・バイオエンジニアリング（Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．Ｂｉｏｅｎｇ．），７３，２６１（２００１）等の文献に記載されているＮＳＯ細胞があげられる。また、理化学研究所細胞開発銀行に登録されているＮＳＯ細胞株（ＲＣＢ０２１３）、あるいはこれら株を生育可能な培地に馴化させた亜株などもあげられる。
ＳＰ２／０－Ａｇ１４細胞の親株細胞としては、ジャーナル・オブ・イムノロジー（Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．），１２６，３１７，（１９８１）、ネイチャー（Ｎａｔｕｒｅ），２７６，２６９，（１９７８）、ヒューマン・アンチィボディズ・アンド・ハイブリドーマズ（Ｈｕｍａｎ Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ ａｎｄ Ｈｙｂｒｉｄｏｍａｓ），３，１２９，（１９９２）等の文献に記載されているＳＰ２／０－Ａｇ１４細胞があげられる。また、ＡＴＣＣに登録されているＳＰ２／０－Ａｇ１４細胞（ＡＴＣＣ ＣＲＬ－１５８１）あるいはこれら株を生育可能な培地に馴化させた亜株（ＡＴＣＣ ＣＲＬ－１５８１．１）などもあげられる。
チャイニーズハムスター卵巣組織由来ＣＨＯ細胞の親株細胞としては、Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ｅｘｐｅｒｉｍｅｎｔａｌ Ｍｅｄｉｃｉｎｅ，１０８，９４５（１９５８）、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ，６０，１２７５（１９６８）、Ｇｅｎｅｔｉｃｓ，５５，５１３（１９６８）、Ｃｈｒｏｍｏｓｏｍａ，４１，１２９（１９７３）、Ｍｅｔｈｏｄｓ ｉｎ Ｃｅｌｌ Ｓｃｉｅｎｃｅ，１８，１１５（１９９６）、Ｒａｄｉａｔｉｏｎ Ｒｅｓｅａｒｃｈ，１４８，２６０（１９９７）、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ，７７，４２１６（１９８０）、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．６０，１２７５（１９６８）、Ｃｅｌｌ，６，１２１（１９７５）、Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｅｌｌ Ｇｅｎｅｔｉｃｓ，Ａｐｐｅｎｄｉｘ Ｉ，ＩＩ（ｐ．８８３－９００）等の文献に記載されているＣＨＯ細胞などがあげられる。また、ＡＴＣＣに登録されているＣＨＯ－Ｋ１株（ＡＴＣＣ ＣＣＬ－６１）、ＤＵＸＢ１１株（ＡＴＣＣ ＣＲＬ－９０９６）、Ｐｒｏ－５株（ＡＴＣＣ ＣＲＬ－１７８１）や、市販のＣＨＯ－Ｓ株（Ｌｉｆｅｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ社Ｃａｔ＃１１６１９）、あるいはこれら株を生育可能な培地に馴化させた亜株などもあげられる。
ラットミエローマ細胞株ＹＢ２／３ＨＬ．Ｐ２．Ｇ１１．１６Ａｇ．２０細胞の親株細胞としては、Ｙ３／Ａｇ１．２．３細胞（ＡＴＣＣ ＣＲＬ－１６３１）から樹立された株化細胞が包含される。その具体的な例としては、Ｊ．Ｃｅｌｌ．Ｂｉｏｌ．９３，５７６（１９８２）、Ｍｅｔｈｏｄｓ Ｅｎｚｙｍｏｌ．７３Ｂ，１（１９８１）等の文献に記載されているＹＢ２／３ＨＬ．Ｐ２．Ｇ１１．１６Ａｇ．２０細胞があげられる。また、ＡＴＣＣに登録されているＹＢ２／３ＨＬ．Ｐ２．Ｇ１１．１６Ａｇ．２０細胞（ＡＴＣＣ ＣＲＬ－１６６２）あるいはこれら株を生育可能な培地に馴化させた亜株などもあげられる。
本発明において、ＦｃγＲとは、ＩｇＧクラスの抗体に対するＦｃ受容体（以下、ＦｃＲとも表記する）をいう。ＦｃＲとは、抗体のＦｃ領域に結合する受容体を意味する［アニュアル・レビュー・オブ・イムノロジー（Ａｎｎｕ．Ｒｅｖ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．），９，４５７（１９９１）］。ＦｃγＲには、ＦｃγＲＩ、ＦｃγＲＩＩ、ＦｃγＲＩＩＩサブクラスおよびそれらの対立遺伝子変異体およびオルターナティブスプライシングによって生じるアイソフォームも包含される。さらに、ＦｃγＲＩＩは、ＦｃγＲＩＩａおよびＦｃγＲＩＩｂを、ＦｃγＲＩＩＩは、ＦｃγＲＩＩＩａおよびＦｃγＲＩＩＩｂを包含する［アニュアル・レビュー・オブ・イムノロジー（Ａｎｎｕ．Ｒｅｖ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．），９，４５７（１９９１）］。
Ｆｃ領域に結合する全Ｎ－グリコシド結合複合型糖鎖のうち、糖鎖還元末端のＮ－アセチルグルコサミンにフコースが結合していない糖鎖の割合が、好ましくは２０％以上、より

好ましくは３０％以上、さらに好ましくは４０％以上、特に好ましくは５０％以上、最も好ましくは１００％となるように糖鎖を抗体分子のＦｃ領域に結合させることによりＦｃγＲＩＩＩａに対する結合活性を高めることができる。

Ｆｃ領域に結合する全Ｎ－グリコシド結合複合型糖鎖のうち、糖鎖還元末端のＮ－アセチルグルコサミンにフコースが結合していない糖鎖の割合とは、該組成物中に含まれるＦｃ領域に結合する全てのＮ－グリコシド結合複合型糖鎖の合計数に対して、糖鎖還元末端のＮ－アセチルグルコサミンにフコースが結合していない糖鎖の数が占める割合をいう。また、糖鎖の割合は、好ましくは、糖鎖還元末端のＮ－アセチルグルコサミンの６位にフコースの１位がα結合していない糖鎖の割合をいう。

Ｎ－グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のＮ－アセチルグルコサミンにフコースが結合していない糖鎖とは、フコースが、Ｎ－グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のＮ－アセチルグルコサミンにα結合していない糖鎖をいう。好ましくは、フコースの１位がＮ－グリコシド結合複合型糖鎖のＮ－アセチルグルコサミンの６位にα結合していない糖鎖があげられる。

Ｎ－グリコシド結合複合型糖鎖をＦｃ領域に有する抗体分子からなる組成物中に含まれる、糖鎖還元末端のＮ－アセチルグルコサミンにフコースが結合していない糖鎖の割合は、抗体分子からヒドラジン分解や酵素消化などの公知の方法［生物化学実験法２３－糖タンパク質糖鎖研究法（学会出版センター）高橋禮子編（１９８９）］を用い、糖鎖を遊離させ、遊離させた糖鎖を蛍光標識または同位元素標識し、標識した糖鎖をクロマトグラフィー法にて分離することによって決定することができる。また、遊離させた糖鎖をＨＰＡＥＤ－ＰＡＤ法［ジャーナル・オブ・リキッド・クロマトグラフィー（Ｊ．Ｌｉｑ．Ｃｈｒｏｍａｔｏｇｒ．），６，１５７７（１９８３）］によって分析することによっても決定することができる。本発明の方法により、ＦｃγＲＩＩＩａに対する結合活性が高められた抗体組成物は、高いＡＤＣＣ活性を有する。

本発明において、ＡＤＣＣ活性とは、生体内で、腫瘍細胞等の細胞表面抗原などに結合した抗体が、抗体Ｆｃ領域とエフェクター細胞表面上に存在するＦｃＲとの結合を介してエフェクター細胞を活性化し、腫瘍細胞等を障害する活性をいう［モノクローナル・アンティボディズ：プリンシプルズ・アンド・アプリケーションズ（Ｍｏｎｏｃｌｏｎａｌ Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ：Ｐｒｉｎｃｉｐｌｅｓ ａｎｄ Ａｐｐｌｉｃａｔｉｏｎｓ），Ｗｉｌｅｙ－Ｌｉｓｓ，Ｉｎｃ．，Ｃａｐｔｅｒ ２．１（１９９５）］。エフェクター細胞としては、キラー細胞、ナチュラルキラー細胞、単球、マクロファージ等があげられる。

以下、本発明の方法に用いられる、Ｎ－グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のＮ－アセチルグルコサミンにフコースを結合する糖鎖の修飾に関与する蛋白質の活性が低下または欠失した宿主細胞の製造方法について詳細に説明する。

１．本発明の方法に用いられる宿主細胞の作製

本発明の方法に用いられる宿主細胞は、以下に述べる手法により作製することができる。

（１）酵素の遺伝子を標的とした遺伝子破壊の手法

本発明の方法に用いられる宿主細胞は、ＧＤＰ－フコース合成酵素、α１，６－フコース修飾酵素、またはＧＤＰ－フコース輸送蛋白質の遺伝子を標的とし、遺伝子破壊の方法を用いることにより作製することができる。ＧＤＰ－フコース合成酵素としては、具体的には、ＧＭＤ、Ｆｘ、ＧＦＰＰ、Ｆｕｃｏｋｉｎａｓｅなどがあげられる。α１，６－フコース修飾酵素としては、具体的には、α１，６－フコシルトランスフェラーゼ、α－Ｌ－フコシダーゼなどがあげられる。ＧＤＰ－フコース輸送蛋白質としては、具体的には、ＧＤＰ－フコーストランスポーターなどがあげられる。

ここでいう遺伝子とは、ＤＮＡまたはＲＮＡを含む。

遺伝子破壊の方法としては、標的とする酵素の遺伝子を破壊することができる方法であればいかなる方法も包含される。その例としては、アンチセンス法、リボザイム法、相同組換え法、ＲＮＡ－ＤＮＡ ｏｌｉｇｏｎｕｃｌｅｏｔｉｄｅ（ＲＤＯ）法、ＲＮＡ ｉｎｔｅｒｆｅｒｅｎｃｅ（ＲＮＡｉ）法、レトロウイルスを用いた方法、トランスポゾンを

用いた方法等があげられる。以下これらを具体的に説明する。

（ａ）アンチセンス法またはリボザイム法による本発明の方法に用いられる宿主細胞の作製

本発明の方法に用いられる宿主細胞は、ＧＤＰ－フコース合成酵素、α１，６－フコース修飾酵素、またはＧＤＰ－フコース輸送蛋白質遺伝子を標的とし、細胞工学，１２，２３９（１９９３）、バイオ／テクノロジー（ＢＩＯ／ＴＥＣＨＮＯＬＯＧＹ），１７，１０９７（１９９９）、ヒューマン・モレキュラー・ジェネティクス（Ｈｕｍ．Ｍｏｌ．Ｇｅｎｅｔ．），５，１０８３（１９９５）、細胞工学，１３，２５５（１９９４）、プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス（Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．Ｕ．Ｓ．Ａ．），９６，１８８６（１９９９）等に記載されたアンチセンス法またはリボザイム法を用いて、例えば、以下のように作製することができる。

ＧＤＰ－フコース合成酵素、α１，６－フコース修飾酵素、またはＧＤＰ－フコース輸送蛋白質をコードするｃＤＮＡあるいはゲノムＤＮＡを調製する。

調製したあるいはゲノムＤＮＡの塩基配列を決定する。

決定したＤＮＡの配列に基づき、ＧＤＰ－フコース合成酵素、α１，６－フコース修飾酵素、またはＧＤＰ－フコース輸送蛋白質をコードするＤＮＡ部分、非翻訳領域の部分あるいはイントロン部分を含む適当な長さのアンチセンス遺伝子またはリボザイムのコンストラクトを設計する。

該アンチセンス遺伝子、またはリボザイムを細胞内で発現させるために、調製したＤＮＡの断片、または全長を適当な発現ベクターのプロモーターの下流に挿入することにより、組換えベクターを作製する。

該組換えベクターを、該発現ベクターに適合した宿主細胞に導入することにより形質転換体を得る。

ＧＤＰ－フコース合成酵素、α１，６－フコース修飾酵素、またはＧＤＰ－フコース輸送蛋白質の活性を指標として形質転換体を選択することにより、本発明の方法に用いられる宿主細胞を得ることができる。また、細胞膜上の糖蛋白質の糖鎖構造または産生抗体分子の糖鎖構造を指標として形質転換体を選択することにより、本発明の方法に用いられる宿主細胞を得ることもできる。

本発明の方法に用いられる宿主細胞を作製するために用いられる宿主細胞としては、酵母、動物細胞、昆虫細胞、植物細胞など、標的とするＧＤＰ－フコース合成酵素、α１，６－フコース修飾酵素、またはＧＤＰ－フコース輸送蛋白質の遺伝子を有しているものであればいずれも用いることができる。具体的には、後述の３項に記載の宿主細胞があげられる。

発現ベクターとしては、上記宿主細胞において自立複製可能ないしは染色体中への組み込みが可能で、設計したアンチセンス遺伝子、またはリボザイムを転写できる位置にプロモーターを含有しているものが用いられる。具体的には、後述の３項に記載の発現ベクターがあげられる。

各種宿主細胞への遺伝子の導入方法としては、後述の３項に記載の各種宿主細胞に適した組換えベクターの導入方法を用いることができる。

ＧＤＰ－フコース合成酵素、α１，６－フコース修飾酵素、またはＧＤＰ－フコース輸送蛋白質の活性を指標として形質転換体を選択する方法としては、文献［新生化学実験講座３－糖質Ⅰ，糖タンパク質（東京化学同人）日本生化学会編（１９８８）］、文献［細胞工学，別冊，実験プロトコールシリーズ，グライコバイオロジー実験プロトコール，糖タンパク質・糖脂質・プロテオグリカン（秀潤社）谷口直之・鈴木明美・古川清・菅原一幸監修（１９９６）］、モレキュラー・クローニング第２版、カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー等に記載された生化学的な方法あるいは遺伝子工学的な方法などがあげられる。生化学的な方法としては、例えば、酵素特異的な基質を用いて酵素活性を評価する方法があげられる。遺伝子工学的な方法としては、例えば、酵素遺伝子のｍＲＮＡ量を測定するノーザン解析やＲＴ－ＰＣＲ法等があげられる。

細胞膜上の糖蛋白質の糖鎖構造を指標として形質転換体を選択する方法としては、例えば、後述の１の（５）項に記載の方法があげられる。産生抗体分子の糖鎖構造を指標として形質転換体を選択する方法としては、例えば、後述の６項または後述の７項に記載の方法があげられる。

ＧＤＰ－フコース合成酵素、α１，６－フコース修飾酵素、またはＧＤＰ－フコース輸送蛋白質をコードするｃＤＮＡを調製する方法としては、以下に記載の方法があげられる。

ＤＮＡの調製方法

ヒトまたは非ヒト動物の組織または細胞から全ＲＮＡまたはｍＲＮＡを調製する。

ヒトまたは非ヒト動物の組織または細胞のｍＲＮＡは市販のもの（例えばＣｌｏｎｔｅｃｈ社製）を用いても良いし、以下の如くヒトまたは非ヒト動物の組織または細胞から調製しても良い。ヒトまたは非ヒト動物の組織または細胞から全ＲＮＡを調製する方法としては、チオシアン酸グアニジン－トリフルオロ酢酸セシウム法［メソッズ・イン・エンザイモロジー（Ｍｅｔｈｏｄｓ ｉｎ Ｅｎｚｙｍｏｌｏｇｙ），１５４，３（１９８７）］、酸性チオシアン酸グアニジン・フェノール・クロロホルム（ＡＧＰＣ）法［アナリティカル・バイオケミストリー（Ａｎａｌｙｔｉｃａｌ Ｂｉｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ），１６２，１５６（１９８７）；実験医学、９，１９３７（１９９１）］などがあげられる。

また、全ＲＮＡからｐｏｌｙ（Ａ）$^{+}$ ＲＮＡとしてｍＲＮＡを調製する方法としては、オリゴ（ｄＴ）固定化セルロースカラム法（モレキュラー・クローニング第２版）等があげられる。

さらに、Ｆａｓｔ Ｔｒａｃｋ ｍＲＮＡ Ｉｓｏｌａｔｉｏｎ Ｋｉｔ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ社製）、Ｑｕｉｃｋ Ｐｒｅｐ ｍＲＮＡ Ｐｕｒｉｆｉｃａｔｉｏｎ Ｋｉｔ（Ｐｈａｒｍａｃｉａ社製）などのキットを用いることによりｍＲＮＡを調製することができる。

調製したヒトまたは非ヒト動物の組織または細胞全ＲＮＡまたはｍＲＮＡからｃＤＮＡライブラリーを作製する。

ｃＤＮＡライブラリー作製法としては、モレキュラー・クローニング第２版、カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー等に記載された方法、あるいは市販のキット、例えばＳｕｐｅｒＳｃｒｉｐｔ Ｐｌａｓｍｉｄ Ｓｙｓｔｅｍ ｆｏｒ ｃＤＮＡ Ｓｙｎｔｈｅｓｉｓ ａｎｄ Ｐｌａｓｍｉｄ Ｃｌｏｎｉｎｇ（Ｌｉｆｅ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ社製）、ＺＡＰ－ｃＤＮＡ Ｓｙｎｔｈｅｓｉｓ Ｋｉｔ（ＳＴＲＡＴＡＧＥＮＥ社製）を用いる方法などがあげられる。

ｃＤＮＡライブラリーを作製するためのクローニングベクターとしては、大腸菌Ｋ１２株中で自立複製できるものであれば、ファージベクター、プラスミドベクター等いずれでも使用できる。具体的には、ＺＡＰ Ｅｘｐｒｅｓｓ［ＳＴＲＡＴＡＧＥＮＥ社、ストラテジーズ（Ｓｔｒａｔｅｇｉｅｓ），５，５８（１９９２）］、ｐＢｌｕｅｓｃｒｉｐｔ ＩＩ ＳＫ（＋）［ヌクレイック・アシッド・リサーチ（Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓｅａｒｃｈ），１７，９４９４（１９８９）］、Ｌａｍｂｄａ ＺＡＰ ＩＩ（ＳＴＲＡＴＡＧＥＮＥ社製）、λｇｔ１０、λｇｔ１１［ディーエヌエー・クローニング・ア・プラクティカル・アプローチ（ＤＮＡ ｃｌｏｎｉｎｇ，Ａ Ｐｒａｃｔｉｃａｌ Ａｐｐｒｏａｃｈ），１，４９（１９８５）］、λＴｒｉｐｌＥｘ（Ｃｌｏｎｔｅｃｈ社製）、λＥｘＣｅｌｌ（Ｐｈａｒｍａｃｉａ社製）、ｐＴ７Ｔ３１８Ｕ（Ｐｈａｒｍａｃｉａ社製）、ｐｃＤ２［モレキュラー・セルラー・バイオロジー（Ｍｏｌ．Ｃｅｌｌ．Ｂｉｏｌ．），３，２８０（１９８３）］およびｐＵＣ１８［ジーン（Ｇｅｎｅ），３３，１０３（１９８５）］等をあげることができる。

ｃＤＮＡライブラリーを作製するための宿主微生物としては、微生物であればいずれでも用いることができるが、好ましくは大腸菌が用いられる。具体的には、Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ ｃｏｌｉ ＸＬ１－Ｂｌｕｅ ＭＲＦ’［ＳＴＲＡＴＡＧＥＮＥ社、ストラテジーズ（Ｓｔｒａｔｅｇｉｅｓ），５，８１（１９９２）］、Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ ｃｏｌｉ Ｃ６００［ジェネティクス（Ｇｅｎｅｔｉｃｓ），３９，４４０（１９５４）］、Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ ｃｏｌｉ Ｙ１０８８［サイエンス（Ｓｃｉｅｎｃｅ），２

２２，７７８（１９８３）］、Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ ｃｏｌｉ Ｙ１０９０［サイエンス（Ｓｃｉｅｎｃｅ），２２２，７７８（１９８３）］、Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ ｃｏｌｉ ＮＭ５２２［ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー（Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．），１６６，１（１９８３）］、Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ ｃｏｌｉ Ｋ８０２［ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー（Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．），１６，１１８（１９６６）］およびＥｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ ｃｏｌｉ ＪＭ１０５［ジーン（Ｇｅｎｅ），３８，２７５（１９８５）］等が用いられる。

このｃＤＮＡライブラリーを、そのまま以降の解析に用いてもよいが、不完全長ｃＤＮＡの割合を下げ、なるべく完全長ｃＤＮＡを効率よく取得するために、菅野らが開発したオリゴキャップ法［ジーン（Ｇｅｎｅ），１３８，１７１（１９９４）；ジーン（Ｇｅｎｅ），２００，１４９（１９９７）；蛋白質核酸酵素，４１，６０３（１９９６）；実験医学，１１，２４９１（１９９３）；ｃＤＮＡクローニング（羊土社）（１９９６）；遺伝子ライブラリーの作製法（羊土社）（１９９４）］を用いて調製したｃＤＮＡライブラリーを以下の解析に用いてもよい。

ＧＤＰ－フコース合成酵素、α１，６－フコース修飾酵素、またはＧＤＰ－フコース輸送蛋白質のアミノ酸配列に基づいて、該アミノ酸配列をコードすることが予測される塩基配列の５’端および３’端の塩基配列に特異的なデジェネレイティブプライマーを作製し、作製したｃＤＮＡライブラリーを鋳型としてＰＣＲ法［ピーシーアール・プロトコールズ（ＰＣＲ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ），Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ（１９９０）］を用いてＤＮＡの増幅を行うことにより、ＧＤＰ－フコース合成酵素、α１，６－フコース修飾酵素、またはＧＤＰ－フコース輸送蛋白質をコードする遺伝子断片を取得することができる。

取得した遺伝子断片がＧＤＰ－フコース合成酵素、α１，６－フコース修飾酵素、またはＧＤＰ－フコース輸送蛋白質をコードするＤＮＡであることは、通常用いられる塩基配列解析方法、例えばサンガー（Ｓａｎｇｅｒ）らのジデオキシ法［プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス（Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．Ｕ．Ｓ．Ａ．），７４，５４６３（１９７７）］あるいはＡＢＩ ＰＲＩＳＭ ３７７ＤＮＡシークエンサー（ＰＥ Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ社製）等の塩基配列分析装置を用いて分析することにより、確認することができる。

該遺伝子断片をＤＮＡをプローブとして、ヒトまたは非ヒト動物の組織または細胞に含まれるｍＲＮＡから合成したｃＤＮＡあるいはｃＤＮＡライブラリー対してコロニーハイブリダイゼーションやプラークハイブリダイゼーション（モレキュラー・クローニング第２版）を行うことにより、ＧＤＰ－フコース合成酵素、α１，６－フコース修飾酵素、またはＧＤＰ－フコース輸送蛋白質のＤＮＡを取得することができる。

また、ＧＤＰ－フコース合成酵素、α１，６－フコース修飾酵素、またはＧＤＰ－フコース輸送蛋白質をコードする遺伝子断片を取得するために用いたプライマーを用い、ヒトまたは非ヒト動物の組織または細胞に含まれるｍＲＮＡから合成したｃＤＮＡあるいはｃＤＮＡライブラリーを鋳型として、ＰＣＲ法を用いてスクリーニングを行うことにより、ＧＤＰ－フコース合成酵素、α１，６－フコース修飾酵素、またはＧＤＰ－フコース輸送蛋白質のＤＮＡを取得することもできる。

取得したＧＤＰ－フコース合成酵素、α１，６－フコース修飾酵素、またはＧＤＰ－フコース輸送蛋白質をコードするＤＮＡの塩基配列を末端から、通常用いられる塩基配列解析方法、例えばサンガー（Ｓａｎｇｅｒ）らのジデオキシ法［プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス（Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．Ｕ．Ｓ．Ａ．），７４，５４６３（１９７７）］あるいはＡＢＩ ＰＲＩＳＭ ３７７ＤＮＡシークエンサー（ＰＥ Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ社製）等の塩基配列分析装置を用いて分析することにより、該ＤＮＡの塩基配列を決定する。

決定したｃＤＮＡの塩基配列をもとに、ＢＬＡＳＴ等の相同性検索プログラムを用いて、Ｇｅｎｂａｎｋ、ＥＭＢＬおよびＤＤＢＪなどの塩基配列データベースを検索することにより、データベース中の遺伝子の中でＧＤＰ－フコース合成酵素、α１，６－フコース修

飾酵素、またはＧＤＰ－フコース輸送蛋白質をコードしている遺伝子を決定することもできる。
上記の方法で得られるＧＤＰ－フコース合成酵素をコードする遺伝子の塩基配列としては、例えば、配列番号４８、５１または６５に記載の塩基配列があげられる。α１，６－フコース修飾酵素をコードする遺伝子の塩基配列としては、例えば、配列番号１または２に記載の塩基配列があげられる。ＧＤＰ－フコース輸送蛋白質をコードする遺伝子の塩基配列としては、例えば、配列番号９１、９３、９５または９７記載の塩基配列があげられる。
決定されたＤＮＡの塩基配列に基づいて、フォスフォアミダイト法を利用したパーキン・エルマー社のＤＮＡ合成機Ｍｏｄｅｌ　３９２等のＤＮＡ合成機で化学合成することにより、ＧＤＰ－フコース合成酵素、α１，６－フコース修飾酵素、またはＧＤＰ－フコース輸送蛋白質のｃＤＮＡを取得することもできる。
ＧＤＰ－フコース合成酵素、α１，６－フコース修飾酵素、またはＧＤＰ－フコース輸送蛋白質のゲノムＤＮＡは、例えば、モレキュラー・クローニング第２版やカレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー等に記載された公知の方法があげられる。また、ゲノムＤＮＡライブラリースクリーニングシステム（Ｇｅｎｏｍｅ　Ｓｙｓｔｅｍｓ社製）やＵｎｉｖｅｒｓａｌ　ＧｅｎｏｍｅＷａｌｋｅｒ™　Ｋｉｔｓ（ＣＬＯＮＴＥＣＨ社製）などを用いることにより、調製することができる。
上記の方法で得られるＧＤＰ－フコース合成酵素のゲノムＤＮＡの塩基配列として、例えば配列番号６７または７０に記載の塩基配列があげられる。α１，６－フコース修飾酵素のゲノムＤＮＡの塩基配列として、例えば配列番号３に記載の塩基配列があげられる。ＧＤＰ－フコース輸送蛋白質のゲノムＤＮＡの塩基配列として、例えば配列番号９９または１００に記載の塩基配列があげられる。
また、発現ベクターを用いず、ＧＤＰ－フコース合成酵素、α１，６－フコース修飾酵素、またはＧＤＰ－フコース輸送蛋白質の塩基配列に基づいて設計したアンチセンスオリゴヌクレオチドまたはリボザイムを、直接宿主細胞に導入することで、本発明の方法に用いられる宿主細胞を得ることもできる。
アンチセンスオリゴヌクレオチドまたはリボザイムは、常法またはＤＮＡ合成機を用いることにより調製することができる。具体的には、ＧＤＰ－フコース合成酵素、α１，６－フコース修飾酵素、またはＧＤＰ－フコース輸送蛋白質をコードするｃＤＮＡおよびゲノムＤＮＡの塩基配列のうち、連続した５～１５０塩基、好ましくは５～６０塩基、より好ましくは５～４０塩基に相当する配列を有するオリゴヌクレオチドの配列情報に基づき、該オリゴヌクレオチドと相補的な配列に相当するオリゴヌクレオチド（アンチセンスオリゴヌクレオチド）または該オリゴヌクレオチドの配列を含むリボザイムを合成することで調製することができる。
オリゴヌクレオチドとしては、オリゴＲＮＡおよび該オリゴヌクレオチドの誘導体（以下、オリゴヌクレオチド誘導体という）等があげられる。
オリゴヌクレオチド誘導体としては、オリゴヌクレオチド中のリン酸ジエステル結合がホスフォロチオエート結合に変換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のリン酸ジエステル結合がＮ３’－Ｐ５’ホスフォアミデート結合に変換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のリボースとリン酸ジエステル結合がペプチド核酸結合に変換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のウラシルがＣ－５プロピニルウラシルで置換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のウラシルがＣ－５チアゾールウラシルで置換された誘導体オリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオチド中のシトシンがＣ－５プロピニルシトシンで置換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のシトシンがフェノキサジン修飾シトシン（ｐｈｅｎｏｘａｚｉｎｅ－ｍｏｄｉｆｉｅｄ　ｃｙｔｏｓｉｎｅ）で置換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のリボースが２’－Ｏ－プロピルリボースで置換されたオリゴヌクレオチド誘導体、あるいはオリゴヌクレオチド中のリボースが２’－メトキシエトキシリボースで置換されたオリゴヌクレオチド誘導体等があげられる［細胞工学，１６，

１４６３（１９９７）］。
（ｂ）相同組換え法による本発明の方法に用いられる宿主細胞の作製
本発明の方法に用いられる宿主細胞は、ＧＤＰ－フコース合成酵素、α１，６－フコース修飾酵素、またはＧＤＰ－フコース輸送蛋白質の遺伝子を標的とし、染色体上の標的遺伝子を相同組換え法を用い改変することによって作製することができる。
染色体上の標的遺伝子の改変は、Ｍａｎｉｐｕｌａｔｉｎｇ ｔｈｅ Ｍｏｕｓｅ Ｅｍｂｒｙｏ Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ，Ｓｅｃｏｎｄ Ｅｄｉｔｉｏｎ，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｐｒｅｓｓ（１９９４）（以下、「マニピュレイティング・ザ・マウス・エンブリオ・ア・ラボラトリー・マニュアル」と略す）、Ｇｅｎｅ Ｔａｒｇｅｔｉｎｇ，Ａ Ｐｒａｃｔｉｃａｌ Ａｐｐｒｏａｃｈ，ＩＲＬ Ｐｒｅｓｓ ａｔ Ｏｘｆｏｒｄ Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ Ｐｒｅｓｓ（１９９３）、バイオマニュアルシリーズ ８ ジーンターゲッティング，ＥＳ細胞を用いた変異マウスの作製，羊土社（１９９５）（以下、「ＥＳ細胞を用いた変異マウスの作製」と略す）等に記載の方法を用い、例えば以下のように行うことができる。
ＧＤＰ－フコース合成酵素、α１，６－フコース修飾酵素、またはＧＤＰ－フコース輸送蛋白質のゲノムＤＮＡを調製する。
ゲノムＤＮＡの塩基配列にも基づき、改変する標的遺伝子（例えば、ＧＤＰ－フコース合成酵素、α１，６－フコース修飾酵素、またはＧＤＰ－フコース輸送蛋白質の構造遺伝子、あるいはプロモーター遺伝子）を相同組換えするためのターゲットベクターを作製する。
作製したターゲットベクターを宿主細胞に導入し、標的遺伝子とターゲットベクターの間で相同組換えを起こした細胞を選択することにより、本発明の方法に用いられる宿主細胞を作製することができる。
宿主細胞としては、酵母、動物細胞、昆虫細胞、植物細胞等、標的とするＧＤＰ－フコース合成酵素、α１，６－フコース修飾酵素、またはＧＤＰ－フコース輸送蛋白質の遺伝子を有しているものであればいずれも用いることができる。具体的には、後述の３項に記載の宿主細胞があげられる。
ＧＤＰ－フコース合成酵素、α１，６－フコース修飾酵素、またはＧＤＰ－フコース輸送蛋白質のゲノムＤＮＡを調製する方法としては、上記１の（１）項の（ａ）に記載のゲノムＤＮＡの調製方法などがあげられる。
上記の方法で得られるＧＤＰ－フコース合成酵素のゲノムＤＮＡの塩基配列として、例えば配列番号６７または７０に記載の塩基配列があげられる。α１，６－フコース修飾酵素のゲノムＤＮＡの塩基配列として、例えば配列番号３に記載の塩基配列があげられる。ＧＤＰ－フコース輸送蛋白質のゲノムＤＮＡの塩基配列として、例えば配列番号９９または１００に記載の塩基配列があげられる。
標的遺伝子を相同組換えするためのターゲットベクターは、Ｇｅｎｅ Ｔａｒｇｅｔｉｎｇ，Ａ Ｐｒａｃｔｉｃａｌ Ａｐｐｒｏａｃｈ，ＩＲＬ Ｐｒｅｓｓ ａｔ Ｏｘｆｏｒｄ Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ Ｐｒｅｓｓ（１９９３）、ＥＳ細胞を用いた変異マウスの作製等に記載の方法にしたがって作製することができる。ターゲットベクターは、リプレースメント型、インサーション型いずれでも用いることができる。
各種宿主細胞へのターゲットベクターの導入には、後述の３項に記載の各種宿主細胞に適した組換えベクターの導入方法を用いることができる。
相同組換え体を効率的に選別する方法として、例えば、Ｇｅｎｅ Ｔａｒｇｅｔｉｎｇ，Ａ Ｐｒａｃｔｉｃａｌ Ａｐｐｒｏａｃｈ，ＩＲＬ Ｐｒｅｓｓ ａｔ Ｏｘｆｏｒｄ Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ Ｐｒｅｓｓ（１９９３）、ＥＳ細胞を用いた変異マウスの作製等に記載のポジティブ選択、プロモーター選択、ネガティブ選択、ポリＡ選択などの方法を用いることができる。選別した細胞株の中から目的とする相同組換え体を選択する方法としては、ゲノムＤＮＡに対するサザンハイブリダイゼーション法（モレキュラー・クローニング第２版）やＰＣＲ法［ピーシーアール・プロトコールズ（ＰＣＲ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ），Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ（１９９０）］等があげられる。

（ｃ）ＲＤＯ方法による本発明の細胞の作製
本発明の方法に用いられる宿主細胞は、ＧＤＰ－フコース合成酵素、α１，６－フコース修飾酵素、またはＧＤＰ－フコース輸送蛋白質の遺伝子を標的とし、ＲＤＯ法を用い、例えば、以下のように作製することができる。
ＧＤＰ－フコース合成酵素、α１，６－フコース修飾酵素、またはＧＤＰ－フコース輸送蛋白質のｃＤＮＡあるいはゲノムＤＮＡを調製する。
調製したｃＤＮＡあるいはゲノムＤＮＡの塩基配列を決定する。
決定したＤＮＡの配列に基づき、ＧＤＰ－フコース合成酵素、α１，６－フコース修飾酵素、またはＧＤＰ－フコース輸送蛋白質をコードする部分、非翻訳領域の部分あるいはイントロン部分を含む適当な長さのＲＤＯのコンストラクトを設計し合成する。
合成したＲＤＯを宿主細胞に導入し、標的とした酵素、すなわちＧＤＰ－フコース合成酵素、α１，６－フコース修飾酵素、またはＧＤＰ－フコース輸送蛋白質に変異が生じた形質転換体を選択することにより、本発明の方法に用いられる宿主細胞を作製することができる。
宿主細胞としては、酵母、動物細胞、昆虫細胞、植物細胞等、標的とするＧＤＰ－フコース合成酵素、α１，６－フコース修飾酵素、またはＧＤＰ－フコース輸送蛋白質の遺伝子を有しているものであればいずれも用いることができる。具体的には、後述の３項に記載の宿主細胞があげられる。
各種宿主細胞へのＲＤＯの導入には、後述の３項に記載の各種宿主細胞に適した組み換えベクターの導入方法を用いることができる。
ＧＤＰ－フコース合成酵素、α１，６－フコース修飾酵素、またはＧＤＰ－フコース輸送蛋白質のｃＤＮＡを調製する方法としては、例えば、上記１の（１）項の（ａ）に記載のＤＮＡの調製方法などがあげられる。
ＧＤＰ－フコース合成酵素、α１，６－フコース修飾酵素、またはＧＤＰ－フコース輸送蛋白質のゲノムＤＮＡを調製する方法としては、例えば、上記１の（１）項の（ａ）に記載のゲノムＤＮＡの調製方法などがあげられる。
ＤＮＡの塩基配列は、適当な制限酵素などで切断後、ｐＢｌｕｅｓｃｒｉｐｔ　ＳＫ（－）（Ｓｔｒａｔａｇｅｎｅ社製）等のプラスミドにクローニングし、通常用いられる塩基配列解析方法、例えば、サンガー（Ｓａｎｇｅｒ）らのジデオキシ法［プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス（Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．Ｕ．Ｓ．Ａ．），７４，５４６３（１９７７）］あるいはＡＢＩ　ＰＲＩＳＭ　３７７ＤＮＡシークエンサー（ＰＥ　Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ社製）等の塩基配列分析装置を用いて分析することにより、該ＤＮＡの塩基配列を決定する。
ＲＤＯは、常法またはＤＮＡ合成機を用いることにより調製することができる。
ＲＤＯを宿主細胞に導入し、標的とした酵素、ＧＤＰ－フコース合成酵素、α１，６－フコース修飾酵素、またはＧＤＰ－フコース輸送蛋白質の遺伝子に変異が生じた形質転換体を選択する方法としては、モレキュラー・クローニング第２版、カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー等に記載された染色体上の遺伝子の変異を直接検出する方法があげられる。
また、前記１の（１）項の（ａ）に記載の、導入したＧＤＰ－フコース合成酵素、α１，６－フコース修飾酵素、またはＧＤＰ－フコース輸送蛋白質の活性を指標として形質転換体を選択する方法、後述の１の（５）項に記載の細胞膜上の糖蛋白質の糖鎖構造を指標として形質転換体を選択する方法、あるいは、後述の６項または後述の７項に記載の産生抗体分子の糖鎖構造を指標として形質転換体を選択する方法も用いることができる。
ＲＤＯのコンストラクトは、サイエンス（Ｓｃｉｅｎｃｅ），２７３，１３８６（１９９６）；ネイチャー・メディシン（Ｎａｔｕｒｅ　Ｍｅｄｉｃｉｎｅ），４，２８５（１９９８）；ヘパトロジー（Ｈｅｐａｔｏｌｏｇｙ），２５，１４６２（１９９７）；ジーン・セラピー（Ｇｅｎｅ　Ｔｈｅｒａｐｙ），５，１９６０（１９９９）；ジャーナル・オブ・モレキュラー・メディシン（Ｊ．Ｍｏｌ．Ｍｅｄ．），７５，８２９（１９９７）；プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス（Ｐｒｏｃ

．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ），９６，８７７４（１９９９）；プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス（Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ），９６，８７６８（１９９９）；ヌクレイック・アシッド・リサーチ（Ｎｕｃ．Ａｃｉｄｓ．Ｒｅｓ．），２７，１３２３（１９９９）；インベスティゲーション・オブ・ダーマトロジー（Ｉｎｖｅｓｔ．Ｄｅｍａｔｏｌ．），１１１，１１７２（１９９８）；ネイチャー・バイオテクノロジー（Ｎａｔｕｒｅ Ｂｉｏｔｅｃｈ．），１６，１３４３（１９９８）；ネイチャー・バイオテクノロジー（Ｎａｔｕｒｅ Ｂｉｏｔｅｃｈ．），１８，４３（２０００）；ネイチャー・バイオテクノロジー（Ｎａｔｕｒｅ Ｂｉｏｔｅｃｈ．），１８，５５５（２０００）等の記載に従って設計することができる。

（ｄ）ＲＮＡｉ方法による本発明の方法に用いられる宿主細胞の作製

本発明の方法に用いられる宿主細胞は、ＧＤＰ－フコース合成酵素、α１，６－フコース修飾酵素、またはＧＤＰ－フコース輸送蛋白質の遺伝子を標的とし、ＲＮＡｉ法を用い、例えば、以下のように作製することができる。

ＧＤＰ－フコース合成酵素、α１，６－フコース修飾酵素、またはＧＤＰ－フコース輸送蛋白質のｃＤＮＡを調製する。

調製したｃＤＮＡの塩基配列を決定する。

決定したＤＮＡの配列に基づき、ＧＤＰ－フコース合成酵素、α１，６－フコース修飾酵素、またはＧＤＰ－フコース輸送蛋白質をコードする部分あるいは非翻訳領域の部分を含む適当な長さのＲＮＡｉ遺伝子のコンストラクトを設計する。

該ＲＮＡｉ遺伝子を細胞内で発現させるために、調製したＤＮＡの断片、または全長を適当な発現ベクターのプロモーターの下流に挿入することにより、組換えベクターを作製する。

該組換えベクターを、該発現ベクターに適合した宿主細胞に導入することにより形質転換体を得る。

導入したＧＤＰ－フコース合成酵素、α１，６－フコース修飾酵素、またはＧＤＰ－フコース輸送蛋白質の活性、あるいは産生抗体分子または細胞表面上の糖蛋白質の糖鎖構造を指標に形質転換体を選択することで、本発明の方法に用いられる宿主細胞を得ることができる。

宿主細胞としては、酵母、動物細胞、昆虫細胞、植物細胞等、標的とするＧＤＰ－フコース合成酵素、α１，６－フコース修飾酵素、またはＧＤＰ－フコース輸送蛋白質の遺伝子を有しているものであればいずれも用いることができる。具体的には、後述の３項に記載の宿主細胞があげられる。

発現ベクターとしては、上記宿主細胞において自立複製可能ないしは染色体中への組み込みが可能で、設計したＲＮＡｉ遺伝子を転写できる位置にプロモーターを含有しているものが用いられる。具体的には、後述の３項に記載の発現ベクターがあげられる。

各種宿主細胞への遺伝子の導入には、後述の３項に記載の各種宿主細胞に適した組換えベクターの導入方法を用いることができる。

ＧＤＰ－フコース合成酵素、α１，６－フコース修飾酵素、またはＧＤＰ－フコース輸送蛋白質の活性を指標として形質転換体を選択する方法としては、例えば、前記１の（１）項の（ａ）に記載の方法があげられる。

細胞膜上の糖蛋白質の糖鎖構造を指標として形質転換体を選択する方法としては、例えば、後述の１の（５）項に記載の方法があげられる。産生抗体分子の糖鎖構造を指標として形質転換体を選択する方法としては、例えば、後述の６項または後述の７項に記載の方法があげられる。

ＧＤＰ－フコース合成酵素、α１，６－フコース修飾酵素、またはＧＤＰ－フコース輸送蛋白質のｃＤＮＡを調製する方法としては、例えば、前記１の（１）項の（ａ）に記載されたＤＮＡの調製方法などがあげられる。

また、発現ベクターを用いず、ＧＤＰ－フコース合成酵素、α１，６－フコース修飾酵素、またはＧＤＰ－フコース輸送蛋白質の塩基配列に基づいて設計したＲＮＡｉ遺伝子を、

直接宿主細胞に導入することで、本発明の方法に用いられる宿主細胞を得ることもできる。

ＲＮＡｉ遺伝子は、常法またはＤＮＡ合成機を用いることにより調製することができる。

ＲＮＡｉ遺伝子のコンストラクトは、［ネイチャー（Ｎａｔｕｒｅ），３９１，８０６（１９９８）；プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス（Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ），９５，１５５０２（１９９８）；ネイチャー（Ｎａｔｕｒｅ），３９５，８５４（１９９８）；プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス（Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ），９６，５０４９（１９９９）；セル（Ｃｅｌｌ），９５，１０１７（１９９８）；プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス（Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ），９６，１４５１（１９９９）；プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス（Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ），９５，１３９５９（１９９８）；ネイチャー・セル・バイオロジー（Ｎａｔｕｒｅ Ｃｅｌｌ Ｂｉｏｌ．），２，７０（２０００）］等の記載に従って設計することができる。

（ｅ）トランスポゾンを用いた方法による、本発明の方法に用いられる宿主細胞の作製

本発明の方法に用いられる宿主細胞は、ネイチャー・ジェネティク（Ｎａｔｕｒｅ Ｇｅｎｅｔ．），２５，３５（２０００）等に記載のトランスポゾンのシステムを用い、ＧＤＰ－フコース合成酵素、α１，６－フコース修飾酵素、またはＧＤＰ－フコース輸送蛋白質の活性、あるいは産生抗体分子または細胞膜上の糖蛋白質の糖鎖構造を指標に突然変異体を選択することで、本発明の方法に用いられる宿主細胞を作製することができる。

トランスポゾンのシステムとは、外来遺伝子をランダムに染色体上に挿入させることで突然変異を誘発させるシステムであり、通常、トランスポゾンに挿まれた外来遺伝子を突然変異を誘発させるベクターとして用い、この遺伝子を染色体上にランダムに挿入させるためのトランスポゼースの発現ベクターを同時に細胞の中に導入する。

トランスポゼースは、用いるトランスポゾンの配列に適したものであればいかなるものも用いることができる。

外来遺伝子としては、宿主細胞のＤＮＡに変異を誘起するものであればいかなる遺伝子も用いることができる。

宿主細胞としては、酵母、動物細胞、昆虫細胞、植物細胞等、標的とするＧＤＰ－フコース合成酵素、α１，６－フコース修飾酵素、またはＧＤＰ－フコース輸送蛋白質の遺伝子を有しているものであればいずれも用いることができる。具体的には、後述の３項に記載の宿主細胞があげられる。各種宿主細胞への遺伝子の導入には、後述の３項に記載の各種宿主細胞に適した組み換えベクターの導入方法を用いることができる。

ＧＤＰ－フコース合成酵素、α１，６－フコース修飾酵素、またはＧＤＰ－フコース輸送蛋白質の活性を指標として突然変異体を選択する方法としては、例えば、前記１の（１）項の（ａ）に記載の方法があげられる。

細胞膜上の糖蛋白質の糖鎖構造を指標として突然変異体を選択する方法としては、例えば、後述の１の（５）項に記載の方法があげられる。産生抗体分子の糖鎖構造を指標として突然変異体を選択する方法としては、例えば、後述の６項または後述の７項に記載の方法があげられる。

（２）酵素の遺伝子のドミナントネガティブ体を導入する手法

本発明の方法に用いられる宿主細胞は、ＧＤＰ－フコース合成酵素、α１，６－フコース修飾酵素、またはＧＤＰ－フコース輸送蛋白質の遺伝子を標的とし、該酵素のドミナントネガティブ体を導入する手法を用いることにより作製することができる。ＧＤＰ－フコース合成酵素としては、具体的には、ＧＭＤ、Ｆｘ、ＧＦＰＰ、Ｆｕｃｏｋｉｎａｓｅなどがあげられる。α１，６－フコース修飾酵素としては、具体的には、α１，６－フコシルトランスフェラーゼ、α－Ｌ－フコシダーゼなどがあげられる。ＧＤＰ－フコース輸送蛋白質としては、具体的には、ＧＤＰ－フコーストランスポーターなどがあげられる。

これらの酵素は、基質特異性を有したある特定の反応を触媒する酵素であり、このような

基質特異性を有した触媒作用を有する酵素の活性中心を破壊することで、これらの酵素のドミナントネガティブ体を作製することができる。標的とする酵素のうち、ＧＭＤを例として、そのドミナントネガティブ体に作製について具体的に以下に述べる。
大腸菌由来のＧＭＤの立体構造を解析した結果、４つのアミノ酸（１３３番目のトレオニン、１３５番目のグルタミン酸、１５７番目のチロシン、１６１番目のリジン）が酵素活性に重要な機能を担っていることが明らかにされている［ストラクチャー（Ｓｔｒｕｃｔｕｒｅ），８，２（２０００）］。すなわち、立体構造の情報にもとづきこれら４つのアミノ酸を異なる他のアミノ酸に置換した変異体を作製した結果、いずれの変異体においても有意に酵素活性が低下していたことが示されている。一方、ＧＭＤの補酵素ＮＡＤＰや基質であるＧＤＰ－マンノースとの結合能に関しては、いずれの変異体においてもほとんど変化が観察されていない。従って、ＧＭＤの酵素活性を担うこれら４つのアミノ酸を置換することによりドミナントネガティブ体を作製することができる。大腸菌由来のＧＭＤの結果に基づき、アミノ酸配列情報をもとにした相同性比較や立体構造予測を行うことにより、例えば、ＣＨＯ細胞由来のＧＭＤ（配列番号６５）では、１５５番目のトレオニン、１５７番目のグルタミン酸、１７９番目のチロシン、１８３番目のリジンを他のアミノ酸に置換することによりドミナントネガティブ体を作製することができる。このようなアミノ酸置換を導入した遺伝子の作製は、モレキュラー・クローニング第２版、カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー等に記載された部位特異的変異導入法を用いて行うことができる。
本発明の方法に用いられる宿主細胞は、上述のように作製した標的酵素のドミナントネガティブ体遺伝子を用い、モレキュラー・クローニング第２版、カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー、マニピュレーティング・マウス・エンブリオ第２版等に記載された遺伝子導入の方法に従って、例えば、以下のように作製することができる。
ＧＤＰ－フコース合成酵素、α１，６－フコース修飾酵素、またはＧＤＰ－フコース輸送蛋白質のドミナントネガティブ体をコードする遺伝子（以下、ドミナントネガティブ体遺伝子と略記する）を調製する。
調製したドミナントネガティブ体遺伝子の全長ＤＮＡをもとにして、必要に応じて、該蛋白質をコードする部分を含む適当な長さのＤＮＡ断片を調製する。
該ＤＮＡ断片、または全長ＤＮＡを適当な発現ベクターのプロモーターの下流に挿入することにより、組換えベクターを作製する。
該組換えベクターを、該発現ベクターに適合した宿主細胞に導入することにより、形質転換体を得る。
ＧＤＰ－フコース合成酵素、α１，６－フコース修飾酵素、またはＧＤＰ－フコース輸送蛋白質の活性、あるいは産生抗体分子または細胞膜上の糖蛋白質の糖鎖構造を指標に形質転換体を選択することで、本発明の方法に用いられる宿主細胞を作製することができる。
宿主細胞としては、酵母、動物細胞、昆虫細胞、植物細胞等、標的とするＧＤＰ－フコース合成酵素、α１，６－フコース修飾酵素、またはＧＤＰ－フコース輸送蛋白質の遺伝子を有しているものであればいずれも用いることができる。具体的には、後述の３項に記載の宿主細胞があげられる。
発現ベクターとしては、上記宿主細胞において自立複製可能ないしは染色体中への組み込みが可能で、目的とするドミナントネガティブ体をコードするＤＮＡを転写できる位置にプロモーターを含有しているものが用いられる。具体的には、後述の３項に記載の発現ベクターがあげられる。
各種宿主細胞への遺伝子の導入には、後述の３項に記載の各種宿主細胞に適した組み換えベクターの導入方法を用いることができる。
ＧＤＰ－フコース合成酵素、α１，６－フコース修飾酵素、またはＧＤＰ－フコース輸送蛋白質の活性を指標として形質転換体を選択する方法としては、例えば、前記１の（１）項の（ａ）に記載の方法があげられる。
細胞膜上の糖蛋白質の糖鎖構造を指標として形質転換体を選択する方法としては、例えば

、後述の１の（５）項に記載の方法があげられる。産生抗体分子の糖鎖構造を指標として形質転換体を選択する方法としては、例えば、後述の６項または後述の７項に記載の方法があげられる。

（３）酵素に突然変異を導入する手法

本発明の方法に用いられる宿主細胞は、ＧＤＰ－フコース合成酵素、α１，６－フコース修飾酵素、またはＧＤＰ－フコース輸送蛋白質の遺伝子について突然変異を導入し、該酵素に突然変異を生じた所望の細胞株を選択する手法を用いることにより作製できる。

ＧＤＰ－フコース合成酵素としては、ＧＭＤ、Ｆｘ、ＧＦＰＰ、Ｆｕｃｏｋｉｎａｓｅなどがあげられる。α１，６－フコース修飾酵素としては、具体的には、α１，６－フコシルトランスフェラーゼ、α－Ｌ－フコシダーゼなどがあげられる。ＧＤＰ－フコース輸送蛋白質としては、具体的には、ＧＤＰ－フコーストランスポーターなどがあげられる。

酵素に突然変異を導入する方法としては、１）突然変異誘発処理で親株を処理した突然変異体あるいは自然発生的に生じた突然変異体から、ＧＤＰ－フコース合成酵素、α１，６－フコース修飾酵素、またはＧＤＰ－フコース輸送蛋白質の活性を指標として所望の細胞株を選択する方法、２）突然変異誘発処理で親株を処理した突然変異体あるいは自然発生的に生じた突然変異体から、生産抗体分子の糖鎖構造を指標として所望の細胞株を選択する方法、３）突然変異誘発処理で親株を処理した突然変異体あるいは自然発生的に生じた突然変異体から、該細胞の細胞膜上の糖蛋白質の糖鎖構造を指標として所望の細胞株を選択する方法などがあげられる。

突然変異誘発処理としては、親株の細胞のＤＮＡに点突然変異、欠失あるいはフレームシフト突然変異を誘起するものであればいかなる処理も用いることができる。

具体的には、エチルニトロソウレア、ニトロソグアニジン、ベンゾピレン、アクリジン色素による処理、放射線の照射などがあげられる。また、種々のアルキル化剤や発癌物質も突然変異誘発物質として用いることができる。突然変異誘発物質を細胞に作用させる方法としては、例えば、組織培養の技術　第３版（朝倉書店）日本組織培養学会編（１９９６）、ネイチャー・ジェネティクス（Ｎａｔｕｒｅ　Ｇｅｎｅｔ．），２４，３１４（２０００）等に記載の方法をあげることができる。

自然発生的に生じた突然変異体としては、特別な突然変異誘発処理を施さないで、通常の細胞培養の条件で継代培養を続けることによって自然発生的に生じる突然変異体をあげることができる。

ＧＤＰ－フコース合成酵素、α１，６－フコース修飾酵素、またはＧＤＰ－フコース輸送蛋白質の活性を測定する方法としては、例えば、前記１の（１）項の（ａ）に記載の方法があげられる。産生抗体分子の糖鎖構造を識別する方法としては、例えば、後述の６項または後述の７項に記載の方法があげられる。細胞膜上の糖蛋白質の糖鎖構造を識別する方法としては、例えば、後述の１の（５）項に記載の方法があげられる。

（４）酵素の遺伝子の転写または翻訳を抑制する手法

本発明の方法に用いられる宿主細胞は、ＧＤＰ－フコース合成酵素、α１，６－フコース修飾酵素、またはＧＤＰ－フコース輸送蛋白質の遺伝子を標的とし、アンチセンスＲＮＡ／ＤＮＡ技術［バイオサイエンスとインダストリー，５０，３２２（１９９２）、化学，４６，６８１（１９９１）、Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ，９，３５８（１９９２）、Ｔｒｅｎｄｓ　ｉｎ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ，１０，８７（１９９２）、Ｔｒｅｎｄｓ　ｉｎ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ，１０，１５２（１９９２）、細胞工学，１６，１４６３（１９９７）］、トリプル・ヘリックス技術［Ｔｒｅｎｄｓ　ｉｎ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ，１０，１３２（１９９２）］等を用い、標的とする遺伝子の転写または翻訳を抑制することで作製することができる。

ＧＤＰ－フコース合成酵素としては、具体的には、ＧＭＤ、Ｆｘ、ＧＦＰＰ、Ｆｕｃｏｋｉｎａｓｅなどがあげられる。α１，６－フコース修飾酵素としては、具体的には、α１，６－フコシルトランスフェラーゼ、α－Ｌ－フコシダーゼなどがあげられる。ＧＤＰ－フコース輸送蛋白質としては、具体的には、ＧＤＰ－フコーストランスポーターなどがあげられる。

（５）Ｎ－グリコシド結合糖鎖還元末端のＮ－アセチルグルコサミンの６位とフコースの１位がα結合した糖鎖構造を認識するレクチンに耐性である株を選択する手法
本発明の方法に用いられる宿主細胞は、Ｎ－グリコシド結合糖鎖還元末端のＮ－アセチルグルコサミンの６位とフコースの１位がα結合した糖鎖構造を認識するレクチンに耐性である株を選択する手法を用いることにより作製することができる。
Ｎ－グリコシド結合糖鎖還元末端のＮ－アセチルグルコサミンの６位とフコースの１位がα結合した糖鎖構造を認識するレクチンに耐性である株を選択する手法としては、例えば、ソマティク・セル・アンド・モレキュラー・ジェネティクス（Ｓｏｍａｔｉｃ Ｃｅｌｌ Ｍｏｌ．Ｇｅｎｅｔ．），１２，５１（１９８６）等に記載のレクチンを用いた方法があげられる。
レクチンとしては、Ｎ－グリコシド結合糖鎖還元末端のＮ－アセチルグルコサミンの６位とフコースの１位がα結合した糖鎖構造を認識するレクチンであればいずれのレクチンでも用いることができるが、その具体的な例としては、レンズマメレクチンＬＣＡ（Ｌｅｎｓ Ｃｕｌｉｎａｒｉｓ由来のＬｅｎｔｉｌ Ａｇｇｌｕｔｉｎｉｎ）エンドウマメレクチンＰＳＡ（Ｐｉｓｕｍ ｓａｔｉｖｕｍ由来のＰｅａ Ｌｅｃｔｉｎ）、ソラマメレクチンＶＦＡ（Ｖｉｃｉａ ｆａｂａ由来のＡｇｇｌｕｔｉｎｉｎ）、ヒイロチャワンタケレクチンＡＡＬ（Ａｌｅｕｒｉａ ａｕｒａｎｔｉａ由来のＬｅｃｔｉｎ）等をあげることができる。
具体的には、１μｇ／ｍＬ～１ｍｇ／ｍＬの濃度の上述のレクチンを含む培地で１日～２週間、好ましくは１日～１週間培養し、生存している細胞を継代培養あるいはコロニーをピックアップし別の培養器に移し、さらに引き続きレクチンを含む培地で培養を続けることによって、本発明のＮ－グリコシド結合糖鎖還元末端のＮ－アセチルグルコサミンの６位とフコースの１位がα結合した糖鎖構造を認識するレクチンに耐性である株を選択することができる。
レクチン耐性細胞であることを確認する方法としては、ＧＤＰ－フコース合成酵素、α１，６－フコース修飾酵素またはＧＤＰ－フコース輸送蛋白質の発現を確認する方法、直接レクチンを加えた培地に細胞を培養する方法などがあげられる。具体的には細胞内のα１，６－フコース修飾酵素の一つであるα１，６－フコシルトランスフェラーゼのｍＲＮＡの発現量を測定し、ｍＲＮＡの発現が低下していればレクチン耐性の細胞であるといえる。
２．トランスジェニック非ヒト動物あるいは植物またはそれら子孫の作製
本発明の方法に用いられる細胞は、ＧＤＰ－フコース合成酵素、α１，６－フコース修飾酵素蛋白質およびＧＤＰ－フコース輸送蛋白質からなる群から選ばれる蛋白質の少なくとも１つ以上の蛋白質の活性が低下または欠失するようにゲノム遺伝子が改変されたトランスジェニック非ヒト動物あるいは植物またはそれら子孫を用いて、製造することができる。トランスジェニック非ヒト動物あるいは植物またはそれら子孫は、上述の蛋白質の遺伝子を標的として、１．に記載の手法と同様の手法を用いて作製することができる。
トランスジェニック非ヒト動物の場合、目的とする非ヒト動物、例えばウシ、ヒツジ、ヤギ、ブタ、ウマ、マウス、ラット、ニワトリ、サル、ウサギ等の胚性幹細胞に、前記１項に記載の手法と同様の手法を用いることにより、ＧＤＰ－フコース合成酵素、α１，６－フコース修飾酵素、またはＧＤＰ－フコース輸送蛋白質の活性が低下または欠失された本発明の方法に用いられる胚性幹細胞を作製することができる。
具体的は、染色体上のＧＤＰ－フコース合成酵素、α１，６－フコース修飾酵素またはＧＤＰ－フコース輸送蛋白質をコードする遺伝子を公知の相同組換えの手法［例えば、Ｎａｔｕｒｅ，３２６，６１１０（１９８７）、Ｃｅｌｌ，５１，５０３（１９８７）等］により不活化または任意の配列と置換した変異クローンを作製する。作製した該変異クローンを用い、動物の受精卵の胚盤胞（Ｂｌａｓｔｏｃｙｓｔ）への注入キメラ法または集合キメラ法等の手法により、胚性幹細胞クローンと正常細胞からなるキメラ個体を調製することができる。このキメラ個体と正常個体の掛け合わせにより、全身の細胞でＧＤＰ－フコース合成酵素、α１，６－フコース修飾酵素、またはＧＤＰ－フコース輸送蛋白質の活

性が低下または欠失されたトランスジェニック非ヒト動物を得ることができる。
標的遺伝子を相同組換えするためのターゲットベクターは、Ｇｅｎｅ Ｔａｒｇｅｔｉｎｇ，Ａ Ｐｒａｃｔｉｃａｌ Ａｐｐｒｏａｃｈ，ＩＲＬ Ｐｒｅｓｓ ａｔ Ｏｘｆｏｒｄ Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ Ｐｒｅｓｓ（１９９３）、ＥＳ細胞を用いた変異マウスの作製等に記載の方法にしたがって作製することができる。ターゲットベクターは、リプレースメント型、インサーション型、ジーントラップ型いずれでも用いることができる。
胚性幹細胞へのターゲットベクターの導入方法としては、動物細胞にＤＮＡを導入する方法であればいずれも用いることができ、例えば、エレクトロポレーション法［サイトテクノロジー（Ｃｙｔｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ），３，１３３（１９９０）］、リン酸カルシウム法（特開平２－２２７０７５）、リポフェクション法［プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス（Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．Ｕ．Ｓ．Ａ．），８４，７４１３（１９８７）］、インジェクション法（マニピュレーティング・マウス・エンブリオ第２版）、パーティクルガン（遺伝子銃）を用いる方法（日本特許第２６０６８５６、日本特許第２５１７８１３）、ＤＥＡＥ－デキストラン法［バイオマニュアルシリーズ４－遺伝子導入と発現・解析法（羊土社）横田崇・新井賢一編（１９９４）］、ウイルスベクター法（マニピュレーティング・マウス・エンブリオ第２版）等をあげることができる。
相同組換え体を効率的に選別する方法として、例えば、Ｇｅｎｅ Ｔａｒｇｅｔｉｎｇ，Ａ Ｐｒａｃｔｉｃａｌ Ａｐｐｒｏａｃｈ，ＩＲＬ Ｐｒｅｓｓ ａｔ Ｏｘｆｏｒｄ Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ Ｐｒｅｓｓ（１９９３）、ＥＳ細胞を用いた変異マウスの作製等に記載のポジティブ選択、プロモーター選択、ネガティブ選択、ポリＡ選択などの方法を用いることができる。具体的には、ｈｐｒｔ遺伝子を含むターゲットベクターの場合は、ｈｐｒｔ遺伝子を欠損した胚性幹細胞に導入後、胚性幹細胞をアミノプテリン、ヒポキサンチンおよびチミジンを含む培地で培養し、アミノプテリン耐性の株を選別することにより、ｈｐｒｔ遺伝子を含む相同組換え体を選別するポジティブ選択を行なうことができる。ネオマイシン耐性遺伝子を含むターゲットベクターの場合は、ベクターを導入した胚性幹細胞をＧ４１８を含む培地で培養し、Ｇ４１８耐性の株を選別することにより、ネオマイシン耐性遺伝子を含む相同組換え体を選別するポジティブ選択を行なうことができる。ＤＴ遺伝子を含むターゲットベクターの場合は、ベクターを導入した胚性幹細胞を培養し、生育してきた株を選別する（相同組換え以外のランダムに染色体に挿入された組換え体は、ＤＴ遺伝子が染色体に組み込まれて発現するため、ＤＴの毒性により生育できない）ことにより、ＤＴ遺伝子を含まない相同組換え体を選別するネガティブ選択を行なうことができる。選別した細胞株の中から目的とする相同組換え体を選択する方法としては、ゲノムＤＮＡに対するサザンハイブリダイゼーション法（モレキュラー・クローニング第２版）やＰＣＲ法［ピーシーアール・プロトコールズ（ＰＣＲ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ），Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ（１９９０）］等があげられる。
胚性幹細胞を集合キメラ法を用いて受精卵に取り込ませる場合には、一般に８細胞期以前の発生段階の受精卵を用いることが好ましい。胚性幹細胞を注入キメラ法を用いて受精卵に取り込ませる場合には、一般に８細胞期から胚盤胞の発生段階の受精卵を用いることが好ましい。
雌マウスへ受精卵を移植する場合には、精管結紮雄非ヒト哺乳動物と交配させることにより、受精能を誘起された偽妊娠雌マウスに得られた受精卵を人工的に移植および着床させる方法が好ましく、偽妊娠雌マウスは自然交配によっても得られるが、黄体形成ホルモン放出ホルモン（以下、ＬＨＲＨと略する）あるいはその類縁体を投与後、雄マウスと交配させることにより、受精能を誘起された偽妊娠雌マウスを得ることもできる。ＬＨＲＨの類縁体としては、例えば［３，５－Ｄｉｌ－Ｔｙｒ５］－ＬＨＲＨ、［Ｇｌｎ８］－ＬＨＲＨ、［Ｄ－Ａｌａ６］－ＬＨＲＨ、ｄｅｓ－Ｇｌｙ１０－［Ｄ－Ｈｉｓ（Ｂｚｌ）６］－ＬＨＲＨ ｅｔｈｙｌａｍｉｄｅ等があげられる。
また、目的とする非ヒト動物、例えばウシ、ヒツジ、ヤギ、ブタ、ウマ、マウス、ラット、ニワトリ、サル、ウサギ等の受精卵細胞に、前記１項に記載の手法と同様の手法を用い

ることにより、ＧＤＰ－フコース合成酵素、α１，６－フコース修飾酵素、またはＧＤＰ－フコース輸送蛋白質の活性が低下または欠失された本発明の受精卵細胞を作製することができる。
作製した受精卵細胞を、マニピューレーティング・マウス・エンブリオ第２版等に記載の胚移植の方法を用いて偽妊娠雌の卵管あるいは子宮に移植し出産させることで、ＧＤＰ－フコース合成酵素、α１，６－フコース修飾酵素、またはＧＤＰ－フコース輸送蛋白質の活性が低下または欠失したトランスジェニック非ヒト動物を作製することができる。
トランスジェニック植物の場合、目的とする植物体カルスまたは細胞に、前記１項に記載の手法と同様の手法を用いることにより、ＧＤＰ－フコース合成酵素の活性またはＮ－グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のＮ－アセチルグルコサミンの６位あるいは３位にフコースの１位がα結合する糖鎖修飾に関与する酵素の活性が低下または欠失した本発明のカルスを作製することができる。
作製したカルスを、公知の方法［組織培養，２０（１９９４）；組織培養，２１（１９９５）；トレンド・イン・バイオテクノロジー（Ｔｒｅｎｄｓ ｉｎ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ），１５，４５（１９９７）］に準じてオーキシンおよびサイトカイニンを含む培地で培養することで再分化させ、ＧＤＰ－フコース合成酵素、α１，６－フコース修飾酵素、またはＧＤＰ－フコース輸送蛋白質の活性が低下または欠失したトランスジェニック植物を作製することができる。
３．抗体組成物の製造方法
抗体組成物は、モレキュラー・クローニング第２版、カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー、Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ，Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ ｍａｎｕａｌ，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ，１９８８（以下、アンチボディズと略す）、Ｍｏｎｏｃｌｏｎａｌ Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ：ｐｒｉｎｃｉｐｌｅｓ ａｎｄ ｐｒａｃｔｉｃｅ，Ｔｈｉｒｄ Ｅｄｉｔｉｏｎ，Ａｃａｄ．Ｐｒｅｓｓ，１９９６（以下、モノクローナル・アンチボディズと略す）、Ａｎｔｉｂｏｄｙ Ｅｎｇｉｎｅｅｒｉｎｇ，Ａ Ｐｒａｃｔｉｃａｌ Ａｐｐｒｏａｃｈ，ＩＲＬ Ｐｒｅｓｓ ａｔ Ｏｘｆｏｒｄ Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ Ｐｒｅｓｓ，１９９６（以下、アンチボディエンジニアリングと略す）等に記載された方法を用い、例えば、以下のように宿主細胞中で発現させて取得することができる。
抗体分子の全長ｃＤＮＡを調製し、該抗体分子をコードする部分を含む適当な長さのＤＮＡ断片を調製する。
該ＤＮＡ断片、または全長ｃＤＮＡを適当な発現ベクターのプロモーターの下流に挿入することにより、組換えベクターを作製する。
該組換えベクターを、該発現ベクターに適合した宿主細胞に導入することにより、抗体分子を生産する形質転換体を得ることができる。
宿主細胞としては、酵母、動物細胞、昆虫細胞、植物細胞等、目的とする遺伝子を発現できるものであればいずれも用いることができる。
抗体分子のＦｃ領域に結合するＮ－グリコシド結合糖鎖の修飾に係わる酵素を、遺伝子工学的な手法を用いて導入した、酵母、動物細胞、昆虫細胞、植物細胞等の細胞を宿主細胞として用いることもできる。
発現ベクターとしては、上記宿主細胞において自立複製可能ないしは染色体中への組込が可能で、目的とする抗体分子をコードするＤＮＡを転写できる位置にプロモーターを含有しているものが用いられる。
ＣＤＮＡは、上記１の（１）項の（ａ）に記載のＤＮＡの調製方法に従い、ヒトまたは非ヒト動物の組織または細胞より、目的とする抗体分子に特異的なプローブプライマー等を用いて調製することができる。
酵母を宿主細胞として用いる場合には、発現ベクターとして、例えば、ＹＥＰ１３（ＡＴＣＣ３７１１５）、ＹＥｐ２４（ＡＴＣＣ３７０５１）、ＹＣｐ５０（ＡＴＣＣ３７４１９）等をあげることができる。
プロモーターとしては、酵母菌株中で発現できるものであればいずれのものを用いてもよ

く、例えば、ヘキソースキナーゼ等の解糖系の遺伝子のプロモーター、ＰＨＯ５プロモーター、ＰＧＫプロモーター、ＧＡＰプロモーター、ＡＤＨプロモーター、ｇａｌ１プロモーター、ｇａｌ１０プロモーター、ヒートショック蛋白質プロモーター、ＭＦα１プロモーター、ＣＵＰ１プロモーター等をあげることができる。

宿主細胞としては、サッカロミセス属、シゾサッカロミセス属、クリュイベロミセス属、トリコスポロン属、シュワニオミセス属等に属する酵母、例えば、Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ、Ｓｃｈｉｚｏｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ ｐｏｍｂｅ、Ｋｌｕｙｖｅｒｏｍｙｃｅｓ ｌａｃｔｉｓ、Ｔｒｉｃｈｏｓｐｏｒｏｎ ｐｕｌｌｕｌａｎｓ、Ｓｃｈｗａｎｎｉｏｍｙｃｅｓ ａｌｌｕｖｉｕｓ等をあげることができる。

組換えベクターの導入方法としては、酵母にＤＮＡを導入する方法であればいずれも用いることができ、例えば、エレクトロポレーション法［メソッズ・エンザイモロジー（Ｍｅｔｈｏｄｓ．Ｅｎｚｙｍｏｌ．），１９４，１８２（１９９０）］、スフェロプラスト法［プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス（Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．Ｕ．Ｓ．Ａ），８４，１９２９（１９７８）］、酢酸リチウム法［ジャーナル・オブ・バクテリオロジー（Ｊ．Ｂａｃｔｅｒｉｏｌｏｇｙ），１５３，１６３（１９８３）］、プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス（Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．Ｕ．Ｓ．Ａ），７５，１９２９（１９７８）］に記載の方法等をあげることができる。

動物細胞を宿主として用いる場合には、発現ベクターとして、例えば、ｐｃＤＮＡＩ、ｐｃＤＭ８（フナコシ社製）、ｐＡＧＥ１０７［特開平３－２２９７９；サイトテクノロジー（Ｃｙｔｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ），３，１３３（１９９０）］、ｐＡＳ３－３（特開平２－２２７０７５）、ｐＣＤＭ８［ネイチャー（Ｎａｔｕｒｅ），３２９，８４０（１９８７）］、ｐｃＤＮＡＩ／Ａｍｐ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ社製）、ｐＲＥＰ４（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ社製）、ｐＡＧＥ１０３［ジャーナル・オブ・バイオケミストリー（Ｊ．Ｂｉｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ），１０１，１３０７（１９８７）］、ｐＡＧＥ２１０等をあげることができる。

プロモーターとしては、動物細胞中で発現できるものであればいずれも用いることができ、例えば、サイトメガロウイルス（ＣＭＶ）のＩＥ（ｉｍｍｅｄｉａｔｅ ｅａｒｌｙ）遺伝子のプロモーター、ＳＶ４０の初期プロモーター、レトロウイルスのプロモーター、メタロチオネインプロモーター、ヒートショックプロモーター、ＳＲαプロモーター等をあげることができる。また、ヒトＣＭＶのＩＥ遺伝子のエンハンサーをプロモーターと共に用いてもよい。

宿主細胞としては、ヒトの細胞であるナマルバ（Ｎａｍａｌｗａ）細胞、サルの細胞であるＣＯＳ細胞、チャイニーズ・ハムスターの細胞であるＣＨＯ細胞、ＨＢＴ５６３７（特開昭６３－２９９）、ラットミエローマ細胞、マウスミエローマ細胞、シリアンハムスター腎臓由来細胞、胚性幹細胞、受精卵細胞等をあげることができる。

組換えベクターの導入方法としては、動物細胞にＤＮＡを導入する方法であればいずれも用いることができ、例えば、エレクトロポレーション法［サイトテクノロジー（Ｃｙｔｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ），３，１３３（１９９０）］、リン酸カルシウム法（特開平２－２２７０７５）、リポフェクション法［プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス（Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．Ｕ．Ｓ．Ａ．），８４，７４１３（１９８７）］、インジェクション法［マニピュレイティング・ザ・マウス・エンブリオ・ア・ラボラトリー・マニュアル］、パーティクルガン（遺伝子銃）を用いる方法（日本特許第２６０６８５６、日本特許第２５１７８１３）、ＤＥＡＥ－デキストラン法［バイオマニュアルシリーズ４－遺伝子導入と発現・解析法（羊土社）横田崇・新井賢一編（１９９４）］、ウイルスベクター法（マニピュレーティング・マウス・エンブリオ第２版）等をあげることができる。

昆虫細胞を宿主として用いる場合には、例えばカレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー、Ｂａｃｕｌｏｖｉｒｕｓ Ｅｘｐｒｅｓｓｉｏｎ Ｖｅｃｔｏｒｓ，Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ，Ｗ．Ｈ．Ｆｒｅｅｍａｎ ａｎｄ Ｃｏ

mpany, New York（1992）、バイオ／テクノロジー（Bio／Technology）, 6, 47（1988）等に記載された方法によって、蛋白質を発現することができる。

即ち、組換え遺伝子導入ベクターおよびバキュロウイルスを昆虫細胞に共導入して昆虫細胞培養上清中に組換えウイルスを得た後、さらに組換えウイルスを昆虫細胞に感染させ、蛋白質を発現させることができる。

該方法において用いられる遺伝子導入ベクターとしては、例えば、pVL1392、pVL1393、pBlueBacIII（ともにInvitrogen社製）等をあげることができる。

バキュロウイルスとしては、例えば、夜盗蛾科昆虫に感染するウイルスであるアウトグラファ・カリフォルニカ・ヌクレアー・ポリヘドロシス・ウイルス（Autographa californica nuclear polyhedrosis virus）等を用いることができる。

昆虫細胞としては、Spodopterafrugiperdaの卵巣細胞であるSf9、Sf21［カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジーBaculovirus Expression Vectors, A Laboratory Manual, W. H. Freeman and Company, New York（1992）］、Trichoplusia niの卵巣細胞であるHigh 5（Invitrogen社製）等を用いることができる。

組換えウイルスを調製するための、昆虫細胞への上記組換え遺伝子導入ベクターと上記バキュロウイルスの共導入方法としては、例えば、リン酸カルシウム法（特開平2－227075）、リポフェクション法［プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス（Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.）, 84, 7413（1987）］等をあげることができる。

植物細胞を宿主細胞として用いる場合には、発現ベクターとして、例えば、Tiプラスミド、タバコモザイクウイルスベクター等をあげることができる。

プロモーターとしては、植物細胞中で発現できるものであればいずれのものを用いてもよく、例えば、カリフラワーモザイクウイルス（CaMV）の35Sプロモーター、イネアクチン1プロモーター等をあげることができる。

宿主細胞としては、タバコ、ジャガイモ、トマト、ニンジン、ダイズ、アブラナ、アルファルファ、イネ、コムギ、オオムギ等の植物細胞をあげることができる。

組換えベクターの導入方法としては、植物細胞にDNAを導入する方法であればいずれも用いることができ、例えば、アグロバクテリウム（Agrobacterium）を用いる方法（特開昭59－140885、特開昭60－70080、WO94／00977）、エレクトロポレーション法（特開昭60－251887）、パーティクルガン（遺伝子銃）を用いる方法（日本特許第2606856、日本特許第2517813）等をあげることができる。

遺伝子の発現方法としては、直接発現以外に、モレキュラー・クローニング第2版に記載されている方法等に準じて、分泌生産、Fc領域と他の蛋白質との融合蛋白質発現等を行うことができる。

糖鎖の合成に関与する遺伝子を導入した細菌、酵母、動物細胞、昆虫細胞または植物細胞により発現させた場合には、導入した遺伝子によって糖あるいは糖鎖が付加された抗体分子を得ることができる。

以上のようにして得られる形質転換体を培地に培養し、培養物中に抗体分子を生成蓄積させ、該培養物から採取することにより、抗体組成物を製造することができる。形質転換体を培地に培養する方法は、宿主細胞の培養に用いられる通常の方法に従って行うことができる。

酵母を宿主として得られた形質転換体を培養する培地としては、該生物が資化し得る炭素源、窒素源、無機塩類等を含有し、形質転換体の培養を効率的に行える培地であれば天然培地、合成培地のいずれを用いてもよい。

炭素源としては、該生物が資化し得るものであればよく、グルコース、フラクトース、スクロース、これらを含有する糖蜜、デンプンあるいはデンプン加水分解物等の炭水化物、酢酸、プロピオン酸等の有機酸、エタノール、プロパノールなどのアルコール類等を用いることができる。

窒素源としては、アンモニア、塩化アンモニウム、硫酸アンモニウム、酢酸アンモニウム、リン酸アンモニウム等の無機酸もしくは有機酸のアンモニウム塩、その他の含窒素化合物、ならびに、ペプトン、肉エキス、酵母エキス、コーンスチープリカー、カゼイン加水分解物、大豆粕および大豆粕加水分解物、各種発酵菌体およびその消化物等を用いることができる。

無機塩類としては、リン酸第一カリウム、リン酸第二カリウム、リン酸マグネシウム、硫酸マグネシウム、塩化ナトリウム、硫酸第一鉄、硫酸マン癌、硫酸銅、炭酸カルシウム等を用いることができる。

培養は、通常振盪培養または深部通気攪拌培養などの好気的条件下で行う。培養温度は１５～４０℃がよく、培養時間は、通常１６時間～７日間である。培養中のｐＨは３．０～９．０に保持する。ｐＨの調製は、無機または有機の酸、アルカリ溶液、尿素、炭酸カルシウム、アンモニアなどを用いて行う。

また、培養中必要に応じて、アンピシリンやテトラサイクリン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

プロモーターとして誘導性のプロモーターを用いた組換えベクターで形質転換した酵母を培養するときには、必要に応じてインデューサーを培地に添加してもよい。例えば、ｌａｃプロモーターを用いた組換えベクターで形質転換した酵母を培養するときにはイソプロピル－β－Ｄ－チオガラクトピラノシド等を、ｔｒｐプロモーターを用いた組換えベクターで形質転換した酵母を培養するときにはインドールアクリル酸等を培地に添加してもよい。

動物細胞を宿主として得られた形質転換体を培養する培地としては、一般に使用されているＲＰＭＩ１６４０培地［ザ・ジャーナル・オブ・ザ・アメリカン・メディカル・アソシエイション（Ｔｈｅ Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ ｔｈｅ Ａｍｅｒｉｃａｎ Ｍｅｄｉｃａｌ Ａｓｓｏｃｉａｔｉｏｎ），１９９，５１９（１９６７）］、ＥａｇｌｅのＭＥＭ培地［サイエンス（Ｓｃｉｅｎｃｅ），１２２，５０１（１９５２）］、ダルベッコ改変ＭＥＭ培地邊［ヴュロロジー（Ｖｉｒｏｌｏｇｙ），８，３９６（１９５９）］、１９９培地［プロシーディング・オブ・ザ・ソサイエティ・フォア・ザ・バイオロジカル・メディスン（Ｐｒｏｃｅｅｄｉｎｇ ｏｆ ｔｈｅ Ｓｏｃｉｅｔｙ ｆｏｒ ｔｈｅ Ｂｉｏｌｏｇｉｃａｌ Ｍｅｄｉｃｉｎｅ），７３，１（１９５０）］、Ｗｈｉｔｔｅｎ培地［発生工学実験マニュアル－トランスジェニック・マウスの作り方（講談社）勝木元也編（１９８７）］またはこれら培地に牛胎児血清等を添加した培地等を用いることができる。

培養は、通常ｐＨ６．０～８．０、３０～４０℃、５％CO_2存在下等の条件下で１～７日間行う。

また、培養中必要に応じて、カナマイシン、ペニシリン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

昆虫細胞を宿主として得られた形質転換体を培養する培地としては、一般に使用されているＴＮＭ－ＦＨ培地（Ｐｈａｒｍｉｎｇｅｎ社製）、Ｓｆ－９００ ＩＩ ＳＦＭ培地（Ｌｉｆｅ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ社製）、ＥｘＣｅｌｌ４００、ＥｘＣｅｌｌ４０５（いずれもＪＲＨ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ社製）、Ｇｒａｃｅ’ｓ Ｉｎｓｅｃｔ Ｍｅｄｉｕｍ［ネイチャー（Ｎａｔｕｒｅ），１９５，７８８（１９６２）］等を用いることができる。

培養は、通常ｐＨ６．０～７．０、２５～３０℃等の条件下で、１～５日間行う。

また、培養中必要に応じて、ゲンタマイシン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

植物細胞を宿主として得られた形質転換体は、細胞として、または植物の細胞や器官に分化させて培養することができる。該形質転換体を培養する培地としては、一般に使用されているムラシゲ・アンド・スクーグ（ＭＳ）培地、ホワイト（Ｗｈｉｔｅ）培地、または

これら培地にオーキシン、サイトカイニン等、植物ホルモンを添加した培地等を用いることができる。
培養は、通常ｐＨ５．０～９．０、２０～４０℃の条件下で３～６０日間行う。
また、培養中必要に応じて、カナマイシン、ハイグロマイシン等の抗生物質を培地に添加してもよい。
上記のとおり、抗体分子をコードするＤＮＡを組み込んだ組換え体ベクターを保有する酵母、動物細胞、昆虫細胞あるいは植物細胞由来の形質転換体を、通常の培養方法に従って培養し、抗体組成物を生成蓄積させ、該培養物より抗体組成物を採取することにより、抗体組成物を製造することができる。
抗体遺伝子の発現方法としては、直接発現以外に、モレキュラー・クローニング第２版に記載されている方法に準じて、分泌生産、融合蛋白質発現等を行うことができる。
抗体組成物の生産方法としては、宿主細胞内に生産させる方法、宿主細胞外に分泌させる方法、あるいは宿主細胞外膜上に生産させる方法があり、使用する宿主細胞や、生産させる抗体分子の構造を変えることにより、該方法を選択することができる。
抗体組成物が宿主細胞内あるいは宿主細胞外膜上に生産される場合、ポールソンらの方法［ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー（Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．），２６４，１７６１９（１９８９）］、ロウらの方法［プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス（Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．Ｕ．Ｓ．Ａ．），８６，８２２７（１９８９）；ジーン・デベロップメント（Ｇｅｎｅｓ Ｄｅｖｅｌｏｐ．），４，１２８８（１９９０）］、または特開平５－３３６９６３、特開平６－８２３０２１等に記載の方法を準用することにより、該抗体組成物を宿主細胞外に積極的に分泌させることができる。
すなわち、遺伝子組換えの手法を用いて、発現ベクターに、抗体分子をコードするＤＮＡ、および抗体分子の発現に適切なシグナルペプチドをコードするＤＮＡを挿入し、該発現ベクターを発現させることにより、目的とする抗体分子を宿主細胞外に積極的に分泌させることができる。
また、特開平２－２２７０７５に記載されている方法に準じて、ジヒドロ葉酸還元酵素遺伝子等を用いた遺伝子増幅系を利用して生産量を上昇させることもできる。
さらに、遺伝子導入した動物または植物の細胞を再分化させることにより、遺伝子が導入された動物個体（トランスジェニック非ヒト動物）または植物個体（トランスジェニック植物）を造成し、これらの個体を用いて抗体組成物を製造することもできる。
形質転換体が動物個体または植物個体の場合は、通常の方法に従って、飼育または栽培し、抗体組成物を生成蓄積させ、該動物個体または植物個体より該抗体組成物を採取することにより、該抗体組成物を製造することができる。
動物個体を用いて抗体組成物を製造する方法としては、例えば公知の方法［アメリカン・ジャーナル・オブ・クリニカル・ニュートリション（Ａｍｅｒｉｃａｎ Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ｃｌｉｎｉｃａｌ Ｎｕｔｒｉｔｉｏｎ），６３，６３９Ｓ（１９９６）；アメリカン・ジャーナル・オブ・クリニカル・ニュートリション（Ａｍｅｒｉｃａｎ Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ｃｌｉｎｉｃａｌ Ｎｕｔｒｉｔｉｏｎ），６３，６２７Ｓ（１９９６）；バイオ／テクノロジー（Ｂｉｏ／Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ），９，８３０（１９９１）］に準じて遺伝子を導入して造成した動物中に目的とする抗体組成物を生産する方法があげられる。
動物個体の場合は、例えば、抗体分子をコードするＤＮＡを導入したトランスジェニック非ヒト動物を飼育し、抗体組成物を該動物中に生成蓄積させ、該動物中より抗体組成物を採取することにより、抗体組成物を製造することができる。該動物中の生成蓄積場所としては、例えば、該動物のミルク（特開昭６３－３０９１９２）、卵等をあげることができる。この際に用いられるプロモーターとしては、動物で発現できるものであればいずれも用いることができるが、例えば、乳腺細胞特異的なプロモーターであるαカゼインプロモーター、βカゼインプロモーター、βラクトグロブリンプロモーター、ホエー酸性プロテインプロモーター等が好適に用いられる。

植物個体を用いて抗体組成物を製造する方法としては、例えば抗体分子をコードするＤＮＡを導入したトランスジェニック植物を公知の方法［組織培養，２０（１９９４）；組織培養，２１（１９９５）；トレンド・イン・バイオテクノロジー（Ｔｒｅｎｄｓ ｉｎ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ），１５，４５（１９９７）］に準じて栽培し、抗体組成物を該植物中に生成・蓄積させ、該植物中より該抗体組成物を採取することにより、抗体組成物を生産する方法があげられる。

抗体分子をコードする遺伝子を導入した形質転換体により製造された抗体組成物は、例えば抗体組成物が、細胞内に溶解状態で発現した場合には、培養終了後、細胞を遠心分離により回収し、水系緩衝液にけん濁後、超音波破砕機、フレンチプレス、マントンガウリンホモゲナイザー、ダイノミル等により細胞を破砕し、無細胞抽出液を得る。該無細胞抽出液を遠心分離することにより得られる上清から、通常の酵素の単離精製法、即ち、溶媒抽出法、硫安等による塩析法、脱塩法、有機溶媒による沈殿法、ＤＥＡＥ－セファロース、ＤＩＡＩＯＮ ＨＰＡ－７５（三菱化学（株）製）等レジンを用いた陰イオン交換クロマトグラフィー法、Ｓ－Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ ＦＦ（Ｐｈａｒｍａｃｉａ社製）等のレジンを用いた陽イオン交換クロマトグラフィー法、ブチルセファロース、フェニルセファロース等のレジンを用いた疎水性クロマトグラフィー法、分子篩を用いたゲルろ過法、アフィニティークロマトグラフィー法、クロマトフォーカシング法、等電点電気泳動等の電気泳動法等の手法を単独あるいは組み合わせて用い、抗体組成物の精製標品を得ることができる。

また、抗体組成物が細胞内に不溶体を形成して発現した場合は、同様に細胞を回収後破砕し、遠心分離を行うことにより、沈殿画分として抗体組成物の不溶体を回収する。回収した抗体組成物の不溶体を蛋白質変性剤で可溶化する。該可溶化液を希釈または透析することにより、該抗体組成物を正常な立体構造に戻した後、上記と同様の単離精製法により該抗体組成物の精製標品を得ることができる。

抗体組成物が細胞外に分泌された場合には、培養上清に該抗体組成物あるいはその誘導体を回収することができる。即ち、該培養物を上記と同様の遠心分離等の手法により処理することにより可溶性画分を取得し、該可溶性画分から、上記と同様の単離精製法を用いることにより、抗体組成物の精製標品を得ることができる。

このようにして取得される抗体組成物として、例えば、抗体、抗体の断片、抗体のＦｃ領域の一部を有する融合蛋白質などをあげることができる。

以下に、抗体組成物の取得のより具体的な例として、ヒト化抗体の組成物およびＦｃ融合蛋白質の製造方法について記すが、他の抗体組成物を当該方法と同様にして取得することもできる。

Ａ．ヒト化抗体組成物の製造

（１）ヒト化抗体発現用ベクターの構築

ヒト化抗体発現用ベクターとは、ヒト抗体のＣＨおよびＣＬをコードする遺伝子が組み込まれた動物細胞用発現ベクターであり、動物細胞用発現ベクターにヒト抗体のＣＨおよびＣＬをコードする遺伝子をそれぞれクローニングすることにより構築することができる。

ヒト抗体のＣ領域としては、任意のヒト抗体のＣＨおよびＣＬであることができ、例えば、ヒト抗体のＨ鎖のＩｇＧ１サブクラスのＣ領域（以下、ｈＣγ１と表記する）およびヒト抗体のＬ鎖のκクラスのＣ領域（以下、ｈＣκと表記する）等があげられる。

ヒト抗体のＣＨおよびＣＬをコードする遺伝子としてはエキソンとイントロンから成る染色体ＤＮＡを用いることができ、また、ｃＤＮＡを用いることもできる。

動物細胞用発現ベクターとしては、ヒト抗体のＣ領域をコードする遺伝子を組込み発現できるものであればいかなるものでも用いることができる。例えば、ｐＡＧＥ１０７［サイトテクノロジー（Ｃｙｔｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ），３，１３３（１９９０）］、ｐＡＧＥ１０３［ジャーナル・オブ・バイオケミストリー（Ｊ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．），１０１，１３０７（１９８７）］、ｐＨＳＧ２７４［ジーン（Ｇｅｎｅ），２７，２２３（１９８４）］、ｐＫＣＲ［プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス（Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．Ｕ．Ｓ．Ａ．），７８，１５２７（

１９８１）］、ｐＳＧ１　β　ｄ２－４［サイトテクノロジー（Ｃｙｔｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ），４，１７３（１９９０）］等があげられる。動物細胞用発現ベクターに用いるプロモーターとエンハンサーとしては、ＳＶ４０の初期プロモーターとエンハンサー［ジャーナル・オブ・バイオケミストリー（Ｊ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．），１０１，１３０７（１９８７）］、モロニーマウス白血病ウイルスのＬＴＲ［バイオケミカル・アンド・バイオフィジカル・リサーチ・コミュニケーションズ（Ｂｉｏｃｈｅｍ．Ｂｉｏｐｈｙｓ．Ｒｅｓ．Ｃｏｍｍｕｎ．），１４９，９６０（１９８７）］、免疫グロブリンＨ鎖のプロモーター［セル（Ｃｅｌｌ），４１，４７９（１９８５）］とエンハンサー［セル（Ｃｅｌｌ），３３，７１７（１９８３）］等があげられる。

ヒト化抗体発現用ベクターは、抗体Ｈ鎖およびＬ鎖が別々のベクター上に存在するタイプあるいは同一のベクター上に存在するタイプ（以下、タンデム型と表記する）のどちらでも用いることができるが、ヒト化抗体発現ベクターの構築の容易さ、動物細胞への導入の容易さ、動物細胞内での抗体Ｈ鎖およびＬ鎖の発現量のバランスが均衡する等の点からタンデム型のヒト化抗体発現用ベクターの方が好ましい［ジャーナル・オブ・イムノロジカル・メソッズ（Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．Ｍｅｔｈｏｄｓ），１６７，２７１（１９９４）］。

構築したヒト化抗体発現用ベクターは、ヒト型キメラ抗体およびヒト型ＣＤＲ移植抗体の動物細胞での発現に使用できる。

（２）ヒト以外の動物の抗体のＶ領域をコードするｃＤＮＡの取得

ヒト以外の動物の抗体、例えば、マウス抗体のＶＨおよびＶＬをコードするｃＤＮＡは以下のようにして取得することができる。

目的のマウス抗体を産生するハイブリドーマ細胞よりｍＲＮＡを抽出し、ｃＤＮＡを合成する。合成したｃＤＮＡをファージ或いはプラスミド等のベクターにクローニングしてｃＤＮＡライブラリーを作製する。該ライブラリーより、既存のマウス抗体のＣ領域部分或いはＶ領域部分をプローブとして用い、ＶＨをコードするｃＤＮＡを有する組換えファージ或いは組換えプラスミドおよびＶＬをコードするｃＤＮＡを有する組換えファージ或いは組換えプラスミドをそれぞれ単離する。組換えファージ或いは組換えプラスミド上の目的のマウス抗体のＶＨおよびＶＬの全塩基配列を決定し、塩基配列よりＶＨおよびＶＬの全アミノ酸配列を推定する。

ヒト以外の動物としては、マウス、ラット、ハムスター、ウサギ等、ハイブリドーマ細胞を作製することが可能であれば、いかなるものも用いることができる。

ハイブリドーマ細胞から全ＲＮＡを調製する方法としては、チオシアン酸グアニジン－トリフルオロ酢酸セシウム法［メソッズ・イン・エンザイモロジー（Ｍｅｔｈｏｄｓ　ｉｎ　Ｅｎｚｙｍｏｌ．），１５４，３（１９８７）］、また全ＲＮＡからｍＲＮＡを調製する方法としては、オリゴ（ｄＴ）固定化セルロースカラム法（モレキュラー・クローニング第２版）等があげられる。また、ハイブリドーマ細胞からｍＲＮＡを調製するキットとしては、Ｆａｓｔ　Ｔｒａｃｋ　ｍＲＮＡ　Ｉｓｏｌａｔｉｏｎ　Ｋｉｔ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ社製）、Ｑｕｉｃｋ　Ｐｒｅｐ　ｍＲＮＡ　Ｐｕｒｉｆｉｃａｔｉｏｎ　Ｋｉｔ（Ｐｈａｒｍａｃｉａ社製）等があげられる。

ｃＤＮＡの合成およびｃＤＮＡライブラリー作製法としては、常法（モレキュラー・クローニング第２版）；カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー，Ｓｕｐｐｌｅｍｅｎｔ　１－３４］、或いは市販のキット、例えば、Ｓｕｐｅｒ　ＳｃｒｉｐｔＴＭ　Ｐｌａｓｍｉｄ　Ｓｙｓｔｅｍ　ｆｏｒ　ｃＤＮＡ　Ｓｙｎｔｈｅｓｉｓ　ａｎｄ　Ｐｌａｓｍｉｄ　Ｃｌｏｎｉｎｇ（ＧＩＢＣＯ　ＢＲＬ社製）やＺＡＰ－ｃＤＮＡ　Ｓｙｎｔｈｅｓｉｓ　Ｋｉｔ（Ｓｔｒａｔａｇｅｎｅ社製）を用いる方法などがあげられる。

ｃＤＮＡライブラリーの作製の際、ハイブリドーマ細胞から抽出したｍＲＮＡを鋳型として合成したｃＤＮＡを組み込むベクターは、該ｃＤＮＡを組み込めるベクターであればいかなるものでも用いることができる。例えば、ＺＡＰ　Ｅｘｐｒｅｓｓ［ストラテジーズ（Ｓｔｒａｔｅｇｉｅｓ），５，５８（１９９２）］、ｐＢｌｕｅｓｃｒｉｐｔ　ＩＩ

ＳＫ（＋）［ヌクレイック・アシッズ・リサーチ（Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓｅａｒｃｈ），１７，９４９４（１９８９）］、λｚａｐ ＩＩ（Ｓｔｒａｔａｇｅｎｅ社製）、λｇｔ１０、λｇｔ１１［ディーエヌエー・クローニング：ア・プラクティカル・アプローチ（ＤＮＡ Ｃｌｏｎｉｎｇ：Ａ Ｐｒａｃｔｉｃａｌ Ａｐｐｒｏａｃｈ），Ｉ，４９（１９８５）］、Ｌａｍｂｄａ ＢｌｕｅＭｉｄ（Ｃｌｏｎｔｅｃｈ社製）、λＥｘＣｅｌｌ、ｐＴ７Ｔ３ １８Ｕ（Ｐｈａｒｍａｃｉａ社製）、ｐｃＤ２［モレキュラー・アンド・セルラー・バイオロジー（Ｍｏｌ．Ｃｅｌｌ．Ｂｉｏｌ．），３，２８０（１９８３）］およびｐＵＣ１８［ジーン（Ｇｅｎｅ），３３，１０３（１９８５）］等が用いられる。

ファージ或いはプラスミドベクターにより構築されるｃＤＮＡライブラリーを導入する大腸菌としては該ｃＤＮＡライブラリーを導入、発現および維持できるものであればいかなるものでも用いることができる。例えば、ＸＬ１－Ｂｌｕｅ ＭＲＦ’［ストラテジーズ（Ｓｔｒａｔｅｇｉｅｓ），５，８１（１９９２）］、Ｃ６００［ジェネティックス（Ｇｅｎｅｔｉｃｓ），３９，４４０（１９５４）］、Ｙ１０８８、Ｙ１０９０［サイエンス（Ｓｃｉｅｎｃｅ），２２２，７７８（１９８３）］、ＮＭ５２２［ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー（Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．），１６６，１（１９８３）］、Ｋ８０２［ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー（Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．），１６，１１８（１９６６）］およびＪＭ１０５［ジーン（Ｇｅｎｅ），３８，２７５（１９８５）］等が用いられる。

ｃＤＮＡライブラリーからのヒト以外の動物の抗体のＶＨおよびＶＬをコードするｃＤＮＡクローンの選択法としては、アイソトープ或いは蛍光標識したプローブを用いたコロニー・ハイブリダイゼーション法或いはプラーク・ハイブリダイゼーション法（モレキュラー・クローニング第２版）により選択することができる。また、プライマーを調製し、ｍＲＮＡから合成したｃＤＮＡ或いはｃＤＮＡライブラリーを鋳型として、Ｐｏｌｙｍｅｒａｓｅ Ｃｈａｉｎ Ｒｅａｃｔｉｏｎ［以下、ＰＣＲ法と表記する；モレキュラー・クローニング第２版；カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー，Ｓｕｐｐｌｅｍｅｎｔ １－３４］によりＶＨおよびＶＬをコードするｃＤＮＡを調製することもできる。

上記方法により選択されたｃＤＮＡを、適当な制限酵素などで切断後、ｐＢｌｕｅｓｃｒｉｐｔ ＳＫ（－）（Ｓｔｒａｔａｇｅｎｅ社製）等のプラスミドにクローニングし、通常用いられる塩基配列解析方法、例えばサンガー（Ｓａｎｇｅｒ）らのジデオキシ法［プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス（Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．Ｕ．Ｓ．Ａ．），７４，５４６３（１９７７）］あるいはＡＢＩ ＰＲＩＳＭ ３７７ＤＮＡシークエンサー（ＰＥ Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ社製）等の塩基配列分析装置を用いて分析することにより、該ＤＮＡの塩基配列を決定することができる。

決定した塩基配列からＶＨおよびＶＬの全アミノ酸配列を推定し、既知の抗体のＶＨおよびＶＬの全アミノ酸配列［シーケンシズ・オブ・プロテインズ・オブ・イムノロジカル・インタレスト（Ｓｅｑｕｅｎｃｅｓ ｏｆ Ｐｒｏｔｅｉｎｓ ｏｆ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｉｃａｌ Ｉｎｔｅｒｅｓｔ），ＵＳ Ｄｅｐｔ．Ｈｅａｌｔｈ ａｎｄ Ｈｕｍａｎ Ｓｅｒｖｉｃｅｓ（１９９１）、以下、シーケンシズ・オブ・プロテインズ・オブ・イムノロジカル・インタレストと略す］と比較することにより、取得したｃＤＮＡが分泌シグナル配列を含む抗体のＶＨおよびＶＬの完全なアミノ酸配列をコードしているかを確認することができる。

（３）ヒト以外の動物の抗体のＶ領域のアミノ酸配列の解析

分泌シグナル配列を含む抗体のＶＨおよびＶＬの完全なアミノ酸配列に関しては、既知の抗体のＶＨおよびＶＬの全アミノ酸配列（シーケンシズ・オブ・プロテインズ・オブ・イムノロジカル・インタレスト）と比較することにより、分泌シグナル配列の長さおよびＮ末端アミノ酸配列を推定でき、更にはそれらが属するサブグループを知ることができる。また、ＶＨおよびＶＬの各ＣＤＲのアミノ酸配列についても、既知の抗体のＶＨおよびＶ

Ｌのアミノ酸配列（シーケンシズ・オブ・プロテインズ・オブ・イムノロジカル・インタレスト）と比較することによって見出すことができる。

（４）ヒト型キメラ抗体発現ベクターの構築

前記３の（１）項に記載のヒト化抗体発現用ベクターのヒト抗体のＣＨおよびＣＬをコードする遺伝子の上流に、ヒト以外の動物の抗体のＶＨおよびＶＬをコードするｃＤＮＡをクローニングし、ヒト型キメラ抗体発現ベクターを構築することができる。例えば、ヒト以外の動物の抗体のＶＨおよびＶＬをコードするｃＤＮＡを、ヒト以外の動物の抗体ＶＨおよびＶＬの３’末端側の塩基配列とヒト抗体のＣＨおよびＣＬの５’末端側の塩基配列とから成り、かつ適当な制限酵素の認識配列を両端に有する合成ＤＮＡとそれぞれ連結し、それぞれを前記３の（１）項に記載のヒト化抗体発現用ベクターのヒト抗体のＣＨおよびＣＬをコードする遺伝子の上流にそれらが適切な形で発現するようにクローニングし、ヒト型キメラ抗体発現ベクターを構築することができる。

（５）ヒト型ＣＤＲ移植抗体のＶ領域をコードするｃＤＮＡの構築

ヒト型ＣＤＲ移植抗体のＶＨおよびＶＬをコードするｃＤＮＡは、以下のようにして構築することができる。まず、目的のヒト以外の動物の抗体のＶＨおよびＶＬのＣＤＲを移植するヒト抗体のＶＨおよびＶＬのフレームワーク（以下、ＦＲと表記する）のアミノ酸配列を選択する。ヒト抗体のＶＨおよびＶＬのＦＲのアミノ酸配列としては、ヒト抗体由来のものであれば、いかなるものでも用いることができる。例えば、Ｐｒｏｔｅｉｎ　Ｄａｔａ　Ｂａｎｋ等のデータベースに登録されているヒト抗体のＶＨおよびＶＬのＦＲのアミノ酸配列、ヒト抗体のＶＨおよびＶＬのＦＲの各サブグループの共通アミノ酸配列（シーケンシズ・オブ・プロテインズ・オブ・イムノロジカル・インタレスト）等があげられるが、その中でも、十分な活性を有するヒト型ＣＤＲ移植抗体を作製するためには、目的のヒト以外の動物の抗体のＶＨおよびＶＬのＦＲのアミノ酸配列とできるだけ高い相同性（少なくとも６０％以上）を有するアミノ酸配列を選択することが望ましい。

次に、選択したヒト抗体のＶＨおよびＶＬのＦＲのアミノ酸配列に目的のヒト以外の動物の抗体のＶＨおよびＶＬのＣＤＲのアミノ酸配列を移植し、ヒト型ＣＤＲ移植抗体のＶＨおよびＶＬのアミノ酸配列を設計する。設計したアミノ酸配列を抗体の遺伝子の塩基配列に見られるコドンの使用頻度（シーケンシズ・オブ・プロテインズ・オブ・イムノロジカル・インタレスト）を考慮してＤＮＡ配列に変換し、ヒト型ＣＤＲ移植抗体のＶＨおよびＶＬのアミノ酸配列をコードするＤＮＡ配列を設計する。設計したＤＮＡ配列に基づき、１００塩基前後の長さから成る数本の合成ＤＮＡを合成し、それらを用いてＰＣＲ法を行う。この場合、ＰＣＲでの反応効率および合成可能なＤＮＡの長さから、Ｈ鎖、Ｌ鎖とも６本の合成ＤＮＡを設計することが好ましい。

また、両端に位置する合成ＤＮＡの５’末端に適当な制限酵素の認識配列を導入することで、前記３の（１）項で構築したヒト化抗体発現用ベクターに容易にクローニングすることができる。ＰＣＲ後、増幅産物をｐＢｌｕｅｓｃｒｉｐｔ　ＳＫ（－）（Ｓｔｒａｔａｇｅｎｅ社製）等のプラスミドにクローニングし、前記３の（２）項に記載の方法により、塩基配列を決定し、所望のヒト型ＣＤＲ移植抗体のＶＨおよびＶＬのアミノ酸配列をコードするＤＮＡ配列を有するプラスミドを取得する。

（６）ヒト型ＣＤＲ移植抗体発現ベクターの構築

前記３の（１）項に記載のヒト化抗体発現用ベクターのヒト抗体のＣＨおよびＣＬをコードする遺伝子の上流に、前記３の（５）項で構築したヒト型ＣＤＲ移植抗体のＶＨおよびＶＬをコードするｃＤＮＡをクローニングし、ヒト型ＣＤＲ移植抗体発現ベクターを構築することができる。例えば、前記３の（５）項でヒト型ＣＤＲ移植抗体のＶＨおよびＶＬを構築する際に用いる合成ＤＮＡのうち、両端に位置する合成ＤＮＡの５’末端に適当な制限酵素の認識配列を導入することで、前記３の（１）項に記載のヒト化抗体発現用ベクターのヒト抗体のＣＨおよびＣＬをコードする遺伝子の上流にそれらが適切な形で発現するようにクローニングし、ヒト型ＣＤＲ移植抗体発現ベクターを構築することができる。

（７）ヒト化抗体の安定的生産

前記３の（４）項および（６）項に記載のヒト化抗体発現ベクターを適当な動物細胞に導

入することによりヒト型キメラ抗体およびヒト型ＣＤＲ移植抗体（以下、併せてヒト化抗体と表記する）を安定に生産する形質転換株を得ることができる。
動物細胞へのヒト化抗体発現ベクターの導入法としては、エレクトロポレーション法［特開平２－２５７８９１；サイトテクノロジー（Ｃｙｔｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ），３，１３３（１９９０）］等があげられる。
ヒト化抗体発現ベクターを導入する動物細胞としては、ヒト化抗体を生産させることができる動物細胞であれば、いかなる細胞でも用いることができる。
具体的には、マウスミエローマ細胞であるＮＳＯ細胞、ＳＰ２／０細胞、チャイニーズハムスター卵巣細胞ＣＨＯ／ｄｈｆｒ－細胞、ＣＨＯ／ＤＧ４４細胞、ラットミエローマＹＢ２／０細胞、ＩＲ９８３Ｆ細胞、シリアンハムスター腎臓由来であるＢＨＫ細胞、ヒトミエローマ細胞であるナマルバ細胞などがあげられるが、好ましくは、チャイニーズハムスター卵巣細胞であるＣＨＯ／ＤＧ４４細胞、ラットミエローマＹＢ２／０細胞、前記１項に記載の本発明の方法に用いられる宿主細胞等があげられる。
ヒト化抗体発現ベクターの導入後、ヒト化抗体を安定に生産する形質転換株は、特開平２－２５７８９１に開示されている方法に従い、Ｇ４１８　ｓｕｌｆａｔｅ（以下、Ｇ４１８と表記する；ＳＩＧＭＡ社製）等の薬剤を含む動物細胞培養用培地により選択できる。
動物細胞培養用培地としては、ＲＰＭＩ１６４０培地（日水製薬社製）、ＧＩＴ培地（日本製薬社製）、ＥＸ－ＣＥＬＬ３０２培地（ＪＲＨ社製）、ＩＭＤＭ培地（ＧＩＢＣＯ　ＢＲＬ社製）、Ｈｙｂｒｉｄｏｍａ－ＳＦＭ培地（ＧＩＢＣＯ　ＢＲＬ社製）、またはこれら培地に牛胎児血清（以下、ＦＢＳとも表記する）等の各種添加物を添加した培地等を用いることができる。得られた形質転換株を培地中で培養することで培養上清中にヒト化抗体を生産蓄積させることができる。培養上清中のヒト化抗体の生産量および抗原結合活性は酵素免疫抗体法（以下、ＥＬＩＳＡ法と表記する；アンティボディズ，Ｃｈａｐｔｅｒ　１４、モノクローナル・アンティボディズ）等により測定できる。また、形質転換株は、特開平２－２５７８９１に開示されている方法に従い、ｄｈｆｒ遺伝子増幅系等を利用してヒト化抗体の生産量を上昇させることができる。
ヒト化抗体は、形質転換株の培養上清よりプロテインＡカラムを用いて精製することができる（アンティボディズ，Ｃｈａｐｔｅｒ　８、モノクローナル・アンティボディズ）。また、その他に通常、蛋白質の精製で用いられる精製方法を使用することができる。例えば、ゲル濾過、イオン交換クロマトグラフィーおよび限外濾過等を組み合わせて行い、精製することができる。精製したヒト化抗体のＨ鎖、Ｌ鎖或いは抗体分子全体の分子量は、ポリアクリルアミドゲル電気泳動［以下、ＳＤＳ－ＰＡＧＥと表記する；ネイチャー（Ｎａｔｕｒｅ），２２７，６８０（１９７０）］やウエスタンブロッティング法［アンティボディズ，Ｃｈａｐｔｅｒ　１２、モノクローナル・アンティボディズ］等で測定することができる。
Ｂ．Ｆｃ融合蛋白質の製造
（１）Ｆｃ融合蛋白質発現用ベクターの構築
Ｆｃ融合蛋白質発現用ベクターとは、ヒト抗体のＦｃ領域と融合させる蛋白質とをコードする遺伝子が組み込まれた動物細胞用発現ベクターであり、動物細胞用発現ベクターにヒト抗体のＦｃ領域と融合させる蛋白質とをコードする遺伝子をクローニングすることにより構築することができる。
ヒト抗体のＦｃ領域としては、ＣＨ２とＣＨ３領域を含む領域のほか、ヒンジ領域、ＣＨ１の一部が含まれるものも包含される。またＣＨ２またはＣＨ３の少なくとも１つのアミノ酸が欠失、置換、付加または挿入され、実質的にＦｃγ受容体への結合活性を有するものであればいかなるものでもよい。
ヒト抗体のＦｃ領域と融合させる蛋白質とをコードする遺伝子としてはエキソンとイントロンから成る染色体ＤＮＡを用いることができ、また、ｃＤＮＡを用いることもできる。
それら遺伝子とＦｃ領域を連結する方法としては、各遺伝子配列を鋳型として、ＰＣＲ法（レキュラー・クローニング第２版；カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー，Ｓｕｐｐｌｅｍｅｎｔ　１－３４）を行うことがあげられる。

動物細胞用発現ベクターとしては、ヒト抗体のＣ領域をコードする遺伝子を組込み発現できるものであればいかなるものでも用いることができる。例えば、ｐＡＧＥ１０７［サイトテクノロジー（Ｃｙｔｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ），３，１３３（１９９０）］、ｐＡＧＥ１０３［ジャーナル・オブ・バイオケミストリー（Ｊ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．），１０１，１３０７（１９８７）］、ｐＨＳＧ２７４［ジーン（Ｇｅｎｅ），２７，２２３（１９８４）］、ｐＫＣＲ［プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス（Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．Ｕ．Ｓ．Ａ．），７８，１５２７（１９８１）］、ｐＳＧ１ β ｄ２－４［サイトテクノロジー（Ｃｙｔｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ），４，１７３（１９９０）］等があげられる。動物細胞用発現ベクターに用いるプロモーターとエンハンサーとしては、ＳＶ４０の初期プロモーターとエンハンサー［ジャーナル・オブ・バイオケミストリー（Ｊ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．），１０１，１３０７（１９８７）］、モロニーマウス白血病ウイルスのＬＴＲ［バイオケミカル・アンド・バイオフィジカル・リサーチ・コミュニケーションズ（Ｂｉｏｃｈｅｍ．Ｂｉｏｐｈｙｓ．Ｒｅｓ．Ｃｏｍｍｕｎ．），１４９，９６０（１９８７）］、免疫グロブリンＨ鎖のプロモーター［セル（Ｃｅｌｌ），４１，４７９（１９８５）］とエンハンサー［セル（Ｃｅｌｌ），３３，７１７（１９８３）］等があげられる。

（２）ヒト抗体のＦｃ領域と融合させる蛋白質とをコードするＤＮＡの取得

ヒト抗体のＦｃ領域と融合させる蛋白質とをコードするＤＮＡは以下のようにして取得することができる。

目的のＦｃと融合させる蛋白質を発現している細胞や組織よりｍＲＮＡを抽出し、ｃＤＮＡを合成する。合成したｃＤＮＡをファージ或いはプラスミド等のベクターにクローニングしてｃＤＮＡライブラリーを作製する。該ライブラリーより、目的の蛋白質の遺伝子配列部分をプローブとして用い、目的の蛋白質をコードするｃＤＮＡを有する組換えファージ或いは組換えプラスミドを単離する。組換えファージ或いは組換えプラスミド上の目的の蛋白質の全塩基配列を決定し、塩基配列より全アミノ酸配列を推定する。

ヒト以外の動物としては、マウス、ラット、ハムスター、ウサギ等、細胞や組織を摘出することが可能であれば、いかなるものも用いることができる。

細胞や組織から全ＲＮＡを調製する方法としては、チオシアン酸グアニジン－トリフルオロ酢酸セシウム法［メソッズ・イン・エンザイモロジー（Ｍｅｔｈｏｄｓ ｉｎ Ｅｎｚｙｍｏｌ．），１５４，３（１９８７）］、また全ＲＮＡからｍＲＮＡを調製する方法としては、オリゴ（ｄＴ）固定化セルロースカラム法（モレキュラー・クローニング第２版）等があげられる。また、細胞や組織からｍＲＮＡを調製するキットとしては、Ｆａｓｔ Ｔｒａｃｋ ｍＲＮＡ Ｉｓｏｌａｔｉｏｎ Ｋｉｔ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ社製）、Ｑｕｉｃｋ Ｐｒｅｐ ｍＲＮＡ Ｐｕｒｉｆｉｃａｔｉｏｎ Ｋｉｔ（Ｐｈａｒｍａｃｉａ社製）等があげられる。

ｃＤＮＡの合成及びｃＤＮＡライブラリー作製法としては、常法（モレキュラー・クローニング第２版；カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー，Ｓｕｐｐｌｅｍｅｎｔ １－３４）、或いは市販のキット、例えば、Ｓｕｐｅｒ Ｓｃｒｉｐｔ™ Ｐｌａｓｍｉｄ Ｓｙｓｔｅｍ ｆｏｒ ｃＤＮＡ Ｓｙｎｔｈｅｓｉｓ ａｎｄ Ｐｌａｓｍｉｄ Ｃｌｏｎｉｎｇ（ＧＩＢＣＯ ＢＲＬ社製）やＺＡＰ－ｃＤＮＡＳｙｎｔｈｅｓｉｓ Ｋｉｔ（Ｓｔｒａｔａｇｅｎｅ社製）を用いる方法などがあげられる。

ｃＤＮＡライブラリーの作製の際、細胞や組織から抽出したｍＲＮＡを鋳型として合成したｃＤＮＡを組み込むベクターは、該ｃＤＮＡを組み込めるベクターであればいかなるものでも用いることができる。例えば、ＺＡＰ Ｅｘｐｒｅｓｓ［ストラテジーズ（Ｓｔｒａｔｅｇｉｅｓ），５，５８（１９９２）］、ｐＢｌｕｅｓｃｒｉｐｔ ＩＩ ＳＫ（＋）［ヌクレイック・アシッズ・リサーチ（Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓｅａｒｃｈ），１７，９４９４（１９８９）］、λｚａｐＩＩ（Ｓｔｒａｔａｇｅｎｅ社製）、λｇｔ１０、λｇｔ１１［ディーエヌエー・クローニング：ア・プラクティカル・アプローチ（ＤＮＡ Ｃｌｏｎｉｎｇ：Ａ Ｐｒａｃｔｉｃａｌ Ａｐｐｒｏａｃｈ），Ｉ，４９（１９８５）］、Ｌａｍｂｄａ ＢｌｕｅＭｉｄ（Ｃｌｏｎｔｅｃｈ社製）、λＥｘＣｅ

ｌｌ、ｐＴ７Ｔ３　１８Ｕ（Ｐｈａｒｍａｃｉａ社製）、ｐｃＤ２［モレキュラー・アンド・セルラー・バイオロジー（Ｍｏｌ．Ｃｅｌｌ．Ｂｉｏｌ．），３，２８０（１９８３）］及びｐＵＣ１８［ジーン（Ｇｅｎｅ），３３，１０３（１９８５）］等が用いられる。

ファージ或いはプラスミドベクターにより構築されるｃＤＮＡライブラリーを導入する大腸菌としては該ｃＤＮＡライブラリーを導入、発現及び維持できるものであればいかなるものでも用いることができる。例えば、ＸＬ１－Ｂｌｕｅ　ＭＲＦ’［ストラテジーズ（Ｓｔｒａｔｅｇｉｅｓ），５，８１（１９９２）］、Ｃ６００［ジェネティックス（Ｇｅｎｅｔｉｃｓ），３９，４４０（１９５４）］、Ｙ１０８８、Ｙ１０９０［サイエンス（Ｓｃｉｅｎｃｅ），２２２，７７８（１９８３）］、ＮＭ５２２［ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー（Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．），１６６，１（１９８３）］、Ｋ８０２［ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー（Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．），１６，１１８（１９６６）］及びＪＭ１０５［ジーン（Ｇｅｎｅ），３８，２７５（１９８５）］等が用いられる。

ｃＤＮＡライブラリーからの目的の蛋白質をコードするｃＤＮＡクローンの選択法としては、アイソトープ或いは蛍光標識したプローブを用いたコロニー・ハイブリダイゼーション法或いはプラーク・ハイブリダイゼーション法（モレキュラー・クローニング第２版）により選択することができる。また、プライマーを調製し、ｍＲＮＡから合成したｃＤＮＡ或いはｃＤＮＡライブラリーを鋳型として、ＰＣＲ法により目的の蛋白質をコードするｃＤＮＡを調製することもできる。

目的の蛋白質をヒト抗体のＦｃ領域と融合させる方法としては、ＰＣＲ法があげられる。例えば、目的の蛋白質の遺伝子配列の５’側と３’側に任意の合成オリゴＤＮＡ（プライマー）を設定し、ＰＣＲ法を行いＰＣＲ産物を取得する。同様に、融合させるヒト抗体のＦｃ領域の遺伝子配列に対しても任意のプライマーを設定し、ＰＣＲ産物を得る。このとき、融合させる蛋白質のＰＣＲ産物の３’側とＦｃ領域のＰＣＲ産物の５’側には同じ制限酵素部位もしくは同じ遺伝子配列が存在するようにプライマーを設定する。この連結部分周辺のアミノ酸改変が必要である場合には、その変異を導入したプライマーを用いることで変異を導入する。得られた２種類のＰＣＲ断片を用いてさらにＰＣＲを行うことで、両遺伝子を連結する。もしくは、同一の制限酵素処理をした後にライゲーションすることでも連結することができる。

上記方法により連結された遺伝子配列を、適当な制限酵素などで切断後、ｐＢｌｕｅｓｃｒｉｐｔ　ＳＫ（－）（Ｓｔｒａｔａｇｅｎｅ社製）等のプラスミドにクローニングし、通常用いられる塩基配列解析方法、例えばサンガー（Ｓａｎｇｅｒ）らのジデオキシ法［プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス（Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．Ｕ．Ｓ．Ａ．），７４，５４６３（１９７７）］あるいはＡＢＩ　ＰＲＩＳＭ　３７７ＤＮＡシークエンサー（ＰＥ　Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ社製）等の塩基配列分析装置を用いて分析することにより、該ＤＮＡの塩基配列を決定することができる。

決定した塩基配列からＦｃ融合蛋白質の全アミノ酸配列を推定し、目的のアミノ酸配列と比較することにより、取得したｃＤＮＡが分泌シグナル配列を含むＦｃ融合蛋白質の完全なアミノ酸配列をコードしているかを確認することができる。

（３）Ｆｃ融合蛋白質の安定的生産

前記の（１）項に記載のＦｃ融合蛋白質発現ベクターを適当な動物細胞に導入することによりＦｃ融合蛋白質を安定に生産する形質転換株を得ることができる。

動物細胞へのＦｃ融合蛋白質発現ベクターの導入法としては、エレクトロポレーション法［特開平２－２５７８９１；サイトテクノロジー（Ｃｙｔｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ），３，１３３（１９９０）］等があげられる。

Ｆｃ融合蛋白質発現ベクターを導入する動物細胞としては、Ｆｃ融合蛋白質を生産させることができる動物細胞であれば、いかなる細胞でも用いることができる。

具体的には、マウスミエローマ細胞であるＮＳＯ細胞、ＳＰ２／０細胞、チャイニーズハ

ムスター卵巣細胞ＣＨＯ／ｄｈｆｒ－細胞、ＣＨＯ／ＤＧ４４細胞、ラットミエローマＹＢ２／０細胞、ＩＲ９８３Ｆ細胞、シリアンハムスター腎臓由来であるＢＨＫ細胞、ヒトミエローマ細胞であるナマルバ細胞などがあげられるが、好ましくは、チャイニーズハムスター卵巣細胞であるＣＨＯ／ＤＧ４４細胞、ラットミエローマＹＢ２／０細胞、前記１項に記載の本発明の方法に用いられる宿主細胞等があげられる。

Ｆｃ融合蛋白質発現ベクターの導入後、Ｆｃ融合蛋白質を安定に生産する形質転換株は、特開平２－２５７８９１に開示されている方法に従い、Ｇ４１８等の薬剤を含む動物細胞培養用培地により選択できる。動物細胞培養用培地としては、ＲＰＭＩ１６４０培地（日水製薬社製）、ＧＩＴ培地（日本製薬社製）、ＥＸ－ＣＥＬＬ３０２培地（ＪＲＨ社製）、ＩＭＤＭ培地（ＧＩＢＣＯ　ＢＲＬ社製）、Ｈｙｂｒｉｄｏｍａ－ＳＦＭ培地（ＧＩＢＣＯ　ＢＲＬ社製）、またはこれら培地に牛胎児血清等の各種添加物を添加した培地等を用いることができる。得られた形質転換株を培地中で培養することで培養上清中にＦｃ融合蛋白質を生産蓄積させることができる。培養上清中のＦｃ融合蛋白質の生産量及び抗原結合活性はＥＬＩＳＡ法等により測定できる。また、形質転換株は、特開平２－２５７８９１に開示されている方法に従い、ｄｈｆｒ遺伝子増幅系等を利用してＦｃ融合蛋白質の生産量を上昇させることができる。

Ｆｃ融合蛋白質は、形質転換株の培養上清よりプロテインＡカラムやプロテインＧカラムを用いて精製することができる（アンチボディズ，Ｃｈａｐｔｅｒ　８、モノクローナル・アンティボディズ）。また、その他に通常、タンパク質の精製で用いられる精製方法を使用することができる。例えば、ゲル濾過、イオン交換クロマトグラフィー及び限外濾過等を組み合わせて行い、精製することができる。精製したＦｃ融合蛋白質分子全体の分子量は、ＳＤＳ－ＰＡＧＥ［ネイチャー（Ｎａｔｕｒｅ），２２７，６８０（１９７０）］やウエスタンブロッティング法（アンチボディズ，Ｃｈａｐｔｅｒ　１２、モノクローナル・アンティボディズ）等で測定することができる。

以上、動物細胞を宿主とした抗体組成物の製造方法を示したが、上述したように、酵母、昆虫細胞、植物細胞または動物個体あるいは植物個体においても動物細胞と同様の方法により抗体組成物を製造することができる。

すでに宿主細胞が抗体分子を発現する能力を有する場合には、前記１項に記載した方法を用いて抗体分子を発現させる細胞を調製した後に、該細胞を培養し、該培養物から目的とする抗体組成物を精製することにより、抗体組成物を製造することができる。

４．ＦｃγＲＩＩＩａに対する結合活性の測定

抗体組成物のＦｃγＲＩＩＩａに対する結合活性は、以下に述べる手法により測定することができる。

（１）ＦｃγＲＩＩＩａの調製

ＦｃγＲＩＩＩａとしては、ヒトまたは非ヒト動物の末梢血リンパ球の細胞表面に存在するＦｃγＲＩＩＩａ、ＦｃγＲＩＩＩａをコードする遺伝子を取得し、該遺伝子を宿主細胞へ導入して細胞表面へ発現させたＦｃγＲＩＩＩａあるいは該細胞から分泌させたＦｃγＲＩＩＩａなどを用いることができる。

以下にＦｃγＲＩＩＩａをコードする遺伝子を取得し、該遺伝子を宿主細胞に導入して、宿主細胞上にＦｃγＲＩＩＩａを発現させる方法および該細胞からＦｃγＲＩＩＩａを分泌させることによりＦｃγＲＩＩＩａを取得する方法を述べる。

ヒトまたは非ヒト動物の組織または細胞から全ＲＮＡまたはｍＲＮＡを調製する。

ヒトまたは非ヒト動物の組織または細胞のｍＲＮＡは市販のもの（例えばＣｌｏｎｔｅｃｈ社製）を用いても良いし、以下の如くヒトまたは非ヒト動物の組織または細胞から調製しても良い。ヒトまたは非ヒト動物の組織または細胞から全ＲＮＡを調製する方法としては、チオシアン酸グアニジン－トリフルオロ酢酸セシウム法［メソッズ・イン・エンザイモロジー（Ｍｅｔｈｏｄｓ　ｉｎ　Ｅｎｚｙｍｏｌｏｇｙ），１５４，３（１９８７）］、酸性チオシアン酸グアニジン・フェノール・クロロホルム（ＡＧＰＣ）法［アナリティカル・バイオケミストリー（Ａｎａｌｙｔｉｃａｌ　Ｂｉｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ），１６２，１５６（１９８７）；実験医学、９，１９３７（１９９１）］などがあげられる。

また、全ＲＮＡからｐｏｌｙ（Ａ）$^{+}$ＲＮＡとしてｍＲＮＡを調製する方法としては、オリゴ（ｄＴ）固定化セルロースカラム法（モレキュラー・クローニング第２版）等があげられる。
さらに、Ｆａｓｔ Ｔｒａｃｋ ｍＲＮＡ Ｉｓｏｌａｔｉｏｎ Ｋｉｔ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ社製）、Ｑｕｉｃｋ Ｐｒｅｐ ｍＲＮＡ Ｐｕｒｉｆｉｃａｔｉｏｎ Ｋｉｔ（Ｐｈａｒｍａｃｉａ社製）などのキットを用いることによりｍＲＮＡを調製することができる。
調製したヒトまたは非ヒト動物の組織または細胞全ＲＮＡまたはｍＲＮＡからｃＤＮＡライブラリーを作製する。
ｃＤＮＡライブラリー作製法としては、モレキュラー・クローニング第２版、カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー等に記載された方法、あるいは市販のキット、例えばＳｕｐｅｒＳｃｒｉｐｔ Ｐｌａｓｍｉｄ Ｓｙｓｔｅｍ ｆｏｒ ｃＤＮＡ Ｓｙｎｔｈｅｓｉｓ ａｎｄ Ｐｌａｓｍｉｄ Ｃｌｏｎｉｎｇ（Ｌｉｆｅ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ社製）、ＺＡＰ－ｃＤＮＡ Ｓｙｎｔｈｅｓｉｓ Ｋｉｔ（ＳＴＲＡＴＡＧＥＮＥ社製）を用いる方法などがあげられる。
ｃＤＮＡライブラリーを作製するためのクローニングベクターとしては、大腸菌Ｋ１２株中で自立複製できるものであれば、ファージベクター、プラスミドベクター等いずれでも使用できる。具体的には、ＺＡＰ Ｅｘｐｒｅｓｓ［ＳＴＲＡＴＡＧＥＮＥ社、ストラテジーズ（Ｓｔｒａｔｅｇｉｅｓ），５，５８（１９９２）］、ｐＢｌｕｅｓｃｒｉｐｔ ＩＩ ＳＫ（＋）［ヌクレイック・アシッド・リサーチ（Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓｅａｒｃｈ），１７，９４９４（１９８９）］、Ｌａｍｂｄａ ＺＡＰ ＩＩ（ＳＴＲＡＴＡＧＥＮＥ社製）、λｇｔ１０、λｇｔ１１［ディーエヌエー・クローニング・ア・プラクティカル・アプローチ（ＤＮＡ ｃｌｏｎｉｎｇ，Ａ Ｐｒａｃｔｉｃａｌ Ａｐｐｒｏａｃｈ），１，４９（１９８５）］、λＴｒｉｐｌＥｘ（Ｃｌｏｎｔｅｃｈ社製）、λＥｘＣｅｌｌ（Ｐｈａｒｍａｃｉａ社製）、ｐＴ７Ｔ３１８Ｕ（Ｐｈａｒｍａｃｉａ社製）、ｐｃＤ２［モレキュラー・セルラー・バイオロジー（Ｍｏｌ．Ｃｅｌｌ．Ｂｉｏｌ．），３，２８０（１９８３）］およびｐＵＣ１８［ジーン（Ｇｅｎｅ），３３，１０３（１９８５）］等をあげることができる。
宿主微生物としては、微生物であればいずれでも用いることができるが、好ましくは大腸菌が用いられる。具体的には、Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ ｃｏｌｉ ＸＬ１－Ｂｌｕｅ ＭＲＦ’［ＳＴＲＡＴＡＧＥＮＥ社、ストラテジーズ（Ｓｔｒａｔｅｇｉｅｓ），５，８１（１９９２）］、Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ ｃｏｌｉ Ｃ６００［ジェネティクス（Ｇｅｎｅｔｉｃｓ），３９，４４０（１９５４）］、Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ ｃｏｌｉ Ｙ１０８８［サイエンス（Ｓｃｉｅｎｃｅ），２２２，７７８（１９８３）］、Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ ｃｏｌｉ Ｙ１０９０［サイエンス（Ｓｃｉｅｎｃｅ），２２２，７７８（１９８３）］、Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ ｃｏｌｉ ＮＭ５２２［ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー（Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．），１６６，１（１９８３）］、Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ ｃｏｌｉ Ｋ８０２［ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー（Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．），１６，１１８（１９６６）］およびＥｃｈｅｒｉｃｈｉａ ｃｏｌｉ ＪＭ１０５［ジーン（Ｇｅｎｅ），３８，２７５（１９８５）］等が用いられる。
このｃＤＮＡライブラリーを、そのまま以降の解析に用いてもよいが、不完全長ｃＤＮＡの割合を下げ、なるべく完全長ｃＤＮＡを効率よく取得するために、菅野らが開発したオリゴキャップ法［ジーン（Ｇｅｎｅ），１３８，１７１（１９９４）；ジーン（Ｇｅｎｅ），２００，１４９（１９９７）；蛋白質核酸酵素，４１，６０３（１９９６）；実験医学，１１，２４９１（１９９３）；ｃＤＮＡクローニング（羊土社）（１９９６）；遺伝子ライブラリーの作製法（羊土社）（１９９４）］を用いて調製したｃＤＮＡライブラリーを以下の解析に用いてもよい。
各種ＦｃγＲＩＩＩａの塩基配列に基づいて、５’端および３’端の塩基配列に特異的なプライマーを作製し、作製したｃＤＮＡライブラリーを鋳型としてＰＣＲ法［ピーシーア

ール・プロトコールズ（ＰＣＲ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ），Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ（１９９０）］を用いてＤＮＡの増幅を行うことにより、ＦｃγＲをコードする遺伝子を取得することができる。

取得した遺伝子がＦｃγＲＩＩＩａをコードするＤＮＡであることは、通常用いられる塩基配列解析方法、例えばサンガー（Ｓａｎｇｅｒ）らのジデオキシ法［プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス（Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．Ｕ．Ｓ．Ａ．），７４，５４６３（１９７７）］あるいはＡＢＩ ＰＲＩＳＭ ３７７ＤＮＡシークエンサー（ＰＥ Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ社製）等の塩基配列分析装置を用いて分析することにより、確認することができる。

上記の方法で得られるＦｃγＲＩＩＩａをコードする遺伝子の塩基配列としては、例えば、配列番号２７に記載のＦｃγＲＩＩＩａの塩基配列があげられる。

決定されたＤＮＡの塩基配列に基づいて、フォスフォアミダイト法を利用したパーキン・エルマー社のＤＮＡ合成機Ｍｏｄｅｌ ３９２等のＤＮＡ合成機で化学合成することにより、ＦｃγＲＩＩＩａをコードする遺伝子を取得することもできる。

取得したＦｃγＲＩＩＩａをコードするｃＤＮＡを適当な発現ベクターのプロモーターの下流に挿入することにより、組換えベクターを作製する。

該組換えベクターを、該発現ベクターに適合した宿主細胞に導入することにより、抗体分子を生産する形質転換体を得ることができる。

宿主細胞としては、酵母、動物細胞、昆虫細胞、植物細胞等、目的とする遺伝子を発現できるものであればいずれも用いることができる。

発現ベクターとしては、上記宿主細胞において自立複製可能ないしは染色体中への組込が可能で、目的とするＦｃγＲＩＩＩａをコードするＤＮＡを転写できる位置にプロモーターを含有しているものが用いられる。

酵母を宿主細胞として用いる場合には、発現ベクターとして、例えば、ＹＥＰ１３（ＡＴＣＣ３７１１５）、ＹＥｐ２４（ＡＴＣＣ３７０５１）、ＹＣｐ５０（ＡＴＣＣ３７４１９）等をあげることができる。

プロモーターとしては、酵母菌株中で発現できるものであればいずれのものを用いてもよく、例えば、ヘキソースキナーゼ等の解糖系の遺伝子のプロモーター、ＰＨＯ５プロモーター、ＰＧＫプロモーター、ＧＡＰプロモーター、ＡＤＨプロモーター、ｇａｌ１プロモーター、ｇａｌ１０プロモーター、ヒートショック蛋白質プロモーター、ＭＦα１プロモーター、ＣＵＰ１プロモーター等をあげることができる。

宿主細胞としては、サッカロミセス属、シゾサッカロミセス属、クリュイベロミセス属、トリコスポロン属、シュワニオミセス属等に属する微生物、例えば、Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ、Ｓｃｈｉｚｏｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ ｐｏｍｂｅ、Ｋｌｕｙｖｅｒｏｍｙｃｅｓ ｌａｃｔｉｓ、Ｔｒｉｃｈｏｓｐｏｒｏｎ ｐｕｌｌｕｌａｎｓ、Ｓｃｈｗａｎｎｉｏｍｙｃｅｓ ａｌｌｕｖｉｕｓ等をあげることができる。

組換えベクターの導入方法としては、酵母にＤＮＡを導入する方法であればいずれも用いることができ、例えば、エレクトロポレーション法［メソッズ・エンザイモロジー（Ｍｅｔｈｏｄｓ．Ｅｎｚｙｍｏｌ．），１９４，１８２（１９９０）］、スフェロプラスト法［プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス（Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．Ｕ．Ｓ．Ａ），８４，１９２９（１９７８）］、酢酸リチウム法［ジャーナル・オブ・バクテリオロジー（Ｊ．Ｂａｃｔｅｒｉｏｌｏｇｙ），１５３，１６３（１９８３）］、プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス（Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．Ｕ．Ｓ．Ａ），７５，１９２９（１９７８）に記載の方法等をあげることができる。

動物細胞を宿主として用いる場合には、発現ベクターとして、例えば、ｐｃＤＮＡＩ、ｐｃＤＭ８（フナコシ社製）、ｐＡＧＥ１０７［特開平３－２２９７９；サイトテクノロジー（Ｃｙｔｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ），３，１３３（１９９０）］、ｐＡＳ３－３（特開平２－２２７０７５）、ｐＣＤＭ８［ネイチャー（Ｎａｔｕｒｅ），３２９，８４０（１

９８７）］、ｐｃＤＮＡＩ／Ａｍｐ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ社製）、ｐＲＥＰ４（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ社製）、ｐＡＧＥ１０３［ジャーナル・オブ・バイオケミストリー（Ｊ．Ｂｉｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ），１０１，１３０７（１９８７）］、ｐＡＧＥ２１０等をあげることができる。

プロモーターとしては、動物細胞中で発現できるものであればいずれも用いることができ、例えば、サイトメガロウイルス（ＣＭＶ）のＩＥ（ｉｍｍｅｄｉａｔｅ ｅａｒｌｙ）遺伝子のプロモーター、ＳＶ４０の初期プロモーター、レトロウイルスのプロモーター、メタロチオネインプロモーター、ヒートショックプロモーター、ＳＲαプロモーター等をあげることができる。また、ヒトＣＭＶのＩＥ遺伝子のエンハンサーをプロモーターと共に用いてもよい。

宿主細胞としては、ヒトの細胞であるナマルバ（Ｎａｍａｌｗａ）細胞、サルの細胞であるＣＯＳ細胞、チャイニーズ・ハムスターの細胞であるＣＨＯ細胞、ＨＢＴ５６３７（特開昭６３－２９９）、ラットミエローマ細胞、マウスミエローマ細胞、シリアンハムスター腎臓由来細胞、胚性幹細胞、受精卵細胞等をあげることができる。

組換えベクターの導入方法としては、動物細胞にＤＮＡを導入する方法であればいずれも用いることができ、例えば、エレクトロポレーション法［サイトテクノロジー（Ｃｙｔｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ），３，１３３（１９９０）］、リン酸カルシウム法（特開平２－２２７０７５）、リポフェクション法［プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス（Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．Ｕ．Ｓ．Ａ．），８４，７４１３（１９８７）］、インジェクション法［マニピュレイティング・ザ・マウス・エンブリオ・ア・ラボラトリー・マニュアル］、パーティクルガン（遺伝子銃）を用いる方法［日本特許第２６０６８５６、日本特許第２５１７８１３］、ＤＥＡＥ－デキストラン法［バイオマニュアルシリーズ４－遺伝子導入と発現・解析法（羊土社）横田崇・新井賢一編（１９９４）］、ウイルスベクター法（マニピュレーティング・マウス・エンブリオ第２版）等をあげることができる。

昆虫細胞を宿主として用いる場合には、例えばカレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー、Ｂａｃｕｌｏｖｉｒｕｓ Ｅｘｐｒｅｓｓｉｏｎ Ｖｅｃｔｏｒｓ，Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ，Ｗ．Ｈ．Ｆｒｅｅｍａｎ ａｎｄ Ｃｏｍｐａｎｙ，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ（１９９２）、バイオ／テクノロジー（Ｂｉｏ／Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ），６，４７（１９８８）等に記載された方法によって、蛋白質を発現することができる。

即ち、組換え遺伝子導入ベクターおよびバキュロウイルスを昆虫細胞に共導入して昆虫細胞培養上清中に組換えウイルスを得た後、さらに組換えウイルスを昆虫細胞に感染させ、蛋白質を発現させることができる。

該方法において用いられる遺伝子導入ベクターとしては、例えば、ｐＶＬ１３９２、ｐＶＬ１３９３、ｐＢｌｕｅＢａｃＩＩＩ（ともにＩｎｖｉｔｏｒｏｇｅｎ社製）等をあげることができる。

バキュロウイルスとしては、例えば、夜盗蛾科昆虫に感染するウイルスであるアウトグラファ・カリフォルニカ・ヌクレアー・ポリヘドロシス・ウイルス（Ａｕｔｏｇｒａｐｈａ ｃａｌｉｆｏｒｎｉｃａ ｎｕｃｌｅａｒ ｐｏｌｙｈｅｄｒｏｓｉｓ ｖｉｒｕｓ）を用いることができる。

昆虫細胞としては、Ｓｐｏｄｏｐｔｅｒａｆｒｕｇｉｐｅｒｄａの卵巣細胞であるＳｆ９、Ｓｆ２１［カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー、Ｂａｃｕｌｏｖｉｒｕｓ Ｅｘｐｒｅｓｓｉｏｎ Ｖｅｃｔｏｒｓ，Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ，Ｗ．Ｈ．Ｆｒｅｅｍａｎ ａｎｄ Ｃｏｍｐａｎｙ，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ（１９９２）］、Ｔｒｉｃｈｏｐｌｕｓｉａｎｉの卵巣細胞であるＨｉｇｈ ５（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ社製）等を用いることができる。

組換えウイルスを調製するための、昆虫細胞への上記組換え遺伝子導入ベクターと上記バキュロウイルスの共導入方法としては、例えば、リン酸カルシウム法（特開平２－２２７０７５）、リポフェクション法［プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミ

ー・オブ・サイエンス（Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．Ｕ．Ｓ．Ａ．），８４，７４１３（１９８７）］等をあげることができる。
植物細胞を宿主細胞として用いる場合には、発現ベクターとして、例えば、Ｔｉプラスミド、タバコモザイクウイルスベクター等をあげることができる。
プロモーターとしては、植物細胞中で発現できるものであればいずれのものを用いてもよく、例えば、カリフラワーモザイクウイルス（ＣａＭＶ）の３５Ｓプロモーター、イネアクチン１プロモーター等をあげることができる。
宿主細胞としては、タバコ、ジャガイモ、トマト、ニンジン、ダイズ、アブラナ、アルファルファ、イネ、コムギ、オオムギ等の植物細胞等をあげることができる。
組換えベクターの導入方法としては、植物細胞にＤＮＡを導入する方法であればいずれも用いることができ、例えば、アグロバクテリウム（Ａｇｒｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ）を用いる方法（特開昭５９－１４０８８５、特開昭６０－７００８０、ＷＯ９４／００９７７）、エレクトロポレーション法（特開昭６０－２５１８８７）、パーティクルガン（遺伝子銃）を用いる方法（日本特許第２６０６８５６、日本特許第２５１７８１３）等をあげることができる。
遺伝子の発現方法としては、直接発現以外に、モレキュラー・クローニング第２版に記載されている方法等に準じて、分泌生産、他の蛋白質との融合蛋白質発現等を行うことができる。
以上のようにして得られる形質転換体を培地に培養し、培養物中にＦｃγＲＩＩＩａを生成蓄積させ、該培養物から採取することにより、ＦｃγＲＩＩＩａを製造することができる。形質転換体を培地に培養する方法は、宿主細胞の培養に用いられる通常の方法に従って行うことができる。
酵母を宿主として得られた形質転換体を培養する培地としては、酵母が資化し得る炭素源、窒素源、無機塩類等を含有し、形質転換体の培養を効率的に行える培地であれば天然培地、合成培地のいずれを用いてもよい。
炭素源としては、酵母が資化し得るものであればよく、グルコース、フラクトース、スクロース、これらを含有する糖蜜、デンプンあるいはデンプン加水分解物等の炭水化物、酢酸、プロピオン酸等の有機酸、エタノール、プロパノールなどのアルコール類等を用いることができる。
窒素源としては、アンモニア、塩化アンモニウム、硫酸アンモニウム、酢酸アンモニウム、リン酸アンモニウム等の無機酸もしくは有機酸のアンモニウム塩、その他の含窒素化合物、ならびに、ペプトン、肉エキス、酵母エキス、コーンスチープリカー、カゼイン加水分解物、大豆粕および大豆粕加水分解物、各種発酵菌体およびその消化物等を用いることができる。
無機塩類としては、リン酸第一カリウム、リン酸第二カリウム、リン酸マグネシウム、硫酸マグネシウム、塩化ナトリウム、硫酸第一鉄、硫酸マン癌、硫酸銅、炭酸カルシウム等を用いることができる。
培養は、通常振盪培養または深部通気攪拌培養などの好気的条件下で行う。培養温度は１５～４０℃がよく、培養時間は、通常１６時間～７日間である。培養中のｐＨは３．０～９．０に保持する。ｐＨの調製は、無機または有機の酸、アルカリ溶液、尿素、炭酸カルシウム、アンモニアなどを用いて行う。
また、培養中必要に応じて、アンピシリンやテトラサイクリン等の抗生物質を培地に添加してもよい。
プロモーターとして誘導性のプロモーターを用いた組換えベクターで形質転換した酵母を培養するときには、必要に応じてインデューサーを培地に添加してもよい。例えば、ｌａｃプロモーターを用いた組換えベクターで形質転換した酵母を培養するときにはイソプロピル－β－Ｄ－チオガラクトピラノシド等を、ｔｒｐプロモーターを用いた組換えベクターで形質転換した酵母を培養するときにはインドールアクリル酸等を培地に添加してもよい。
動物細胞を宿主として得られた形質転換体を培養する培地としては、一般に使用されてい

るＲＰＭＩ１６４０培地［ザ・ジャーナル・オブ・ザ・アメリカン・メディカル・アソシエイション（Ｔｈｅ　Ｊｏｕｒｎａｌ　ｏｆ　ｔｈｅ　Ａｍｅｒｉｃａｎ　Ｍｅｄｉｃａｌ　Ａｓｓｏｃｉａｔｉｏｎ），１９９，５１９（１９６７）］、ＥａｇｌｅのＭＥＭ培地［サイエンス（Ｓｃｉｅｎｃｅ），１２２，５０１（１９５２）］、ダルベッコ改変ＭＥＭ培地邊［ヴュロロジー（Ｖｉｒｏｌｏｇｙ），８，３９６（１９５９）］、１９９培地［プロシーディング・オブ・ザ・ソサイエティ・フォア・ザ・バイオロジカル・メディスン（Ｐｒｏｃｅｅｄｉｎｇ　ｏｆ　ｔｈｅ　Ｓｏｃｉｅｔｙ　ｆｏｒ　ｔｈｅ　Ｂｉｏｌｏｇｉｃａｌ　Ｍｅｄｉｃｉｎｅ），７３，１（１９５０）］、Ｗｈｉｔｔｅｎ培地［発生工学実験マニュアル－トランスジェニック・マウスの作り方（講談社）勝木元也編（１９８７）］またはこれら培地に牛胎児血清等を添加した培地等を用いることができる。

培養は、通常ｐＨ６．０～８．０、３０～４０℃、５％CO_2存在下等の条件下で１～７日間行う。

また、培養中必要に応じて、カナマイシン、ペニシリン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

昆虫細胞を宿主として得られた形質転換体を培養する培地としては、一般に使用されているＴＮＭ－ＦＨ培地（Ｐｈａｒｍｉｎｇｅｎ社製）、Ｓｆ－９００　ＩＩ　ＳＦＭ培地（Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ社製）、ＥｘＣｅｌｌ４００、ＥｘＣｅｌｌ４０５（いずれもＪＲＨ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ社製）、Ｇｒａｃｅ’ｓ　Ｉｎｓｅｃｔ　Ｍｅｄｉｕｍ［ネイチャー（Ｎａｔｕｒｅ），１９５，７８８（１９６２）］等を用いることができる。

培養は、通常ｐＨ６．０～７．０、２５～３０℃等の条件下で、１～５日間行う。

また、培養中必要に応じて、ゲンタマイシン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

植物細胞を宿主として得られた形質転換体は、細胞として、または植物の細胞や器官に分化させて培養することができる。該形質転換体を培養する培地としては、一般に使用されているムラシゲ・アンド・スクーグ（ＭＳ）培地、ホワイト（Ｗｈｉｔｅ）培地、またはこれら培地にオーキシン、サイトカイニン等、植物ホルモンを添加した培地等を用いることができる。

培養は、通常ｐＨ５．０～９．０、２０～４０℃の条件下で３～６０日間行う。

また、培養中必要に応じて、カナマイシン、ハイグロマイシン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

上記のとおり、ＦｃγＲＩＩＩａをコードするＤＮＡを組み込んだ組換え体ベクターを保有する微生物、動物細胞、昆虫細胞あるいは植物細胞由来の形質転換体を、通常の培養方法に従って培養し、ＦｃγＲＩＩＩａを生成蓄積させ、該培養物よりＦｃγＲＩＩＩａを採取することにより、ＦｃγＲＩＩＩａを製造することができる。

ＦｃγＲＩＩＩａの発現方法としては、直接発現以外に、モレキュラー・クローニング第２版に記載されている方法に準じて、分泌生産、融合蛋白質発現等を行うことができる。

ＦｃγＲＩＩＩａの生産方法としては、宿主細胞内に生産させる方法、宿主細胞外に分泌させる方法、あるいは宿主細胞外膜上に生産させる方法があり、使用する宿主細胞や、生産させるＦｃγＲＩＩＩａの構造を変えることにより、該方法を選択することができる。

ＦｃγＲＩＩＩａが宿主細胞内あるいは宿主細胞外膜上に生産される場合、ポールソンらの方法［ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー（Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．），２６４，１７６１９（１９８９）］、ロウらの方法［プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス（Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．Ｕ．Ｓ．Ａ．），８６，８２２７（１９８９）；ジーン・デベロップメント（Ｇｅｎｅｓ　Ｄｅｖｅｌｏｐ．），４，１２８８（１９９０）］、または特開平５－３３６９６３、特開平６－８２３０２１等に記載の方法を準用することにより、該ＦｃγＲＩＩＩａを宿主細胞外に積極的に分泌させることができる。

すなわち、遺伝子組換えの手法を用いて、発現ベクターに、ＦｃγＲＩＩＩａをコードするＤＮＡ、およびＦｃγＲＩＩＩａの発現に適切なシグナルペプチドをコードするＤＮＡを挿入し、該発現ベクターを発現させることにより、目的とするＦｃγＲＩＩＩａを宿主

細胞外に積極的に分泌させることができる。
また、特開平２－２２７０７５に記載されている方法に準じて、ジヒドロ葉酸還元酵素遺伝子等を用いた遺伝子増幅系を利用して生産量を上昇させることもできる。
さらに、遺伝子導入した動物または植物の細胞を再分化させることにより、遺伝子が導入された動物個体（トランスジェニック非ヒト動物）または植物個体（トランスジェニック植物）を造成し、これらの個体を用いてＦｃγＲを製造することもできる。
形質転換体が動物個体または植物個体の場合は、通常の方法に従って、飼育または栽培し、ＦｃγＲＩＩＩａを生成蓄積させ、該動物個体または植物個体より該ＦｃγＲＩＩＩａを採取することにより、該ＦｃγＲＩＩＩａを製造することができる。
動物個体を用いてＦｃγＲＩＩＩａを製造する方法としては、例えば公知の方法［アメリカン・ジャーナル・オブ・クリニカル・ニュートリション（Ａｍｅｒｉｃａｎ Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ｃｌｉｎｉｃａｌ Ｎｕｔｒｉｔｉｏｎ），６３，６３９Ｓ（１９９６）；アメリカン・ジャーナル・オブ・クリニカル・ニュートリション（Ａｍｅｒｉｃａｎ Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ｃｌｉｎｉｃａｌ Ｎｕｔｒｉｔｉｏｎ），６３，６２７Ｓ（１９９６）；バイオ／テクノロジー（Ｂｉｏ／Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ），９，８３０（１９９１）］に準じて遺伝子を導入して造成した動物中に目的とするＦｃγＲを生産する方法があげられる。
動物個体の場合は、例えば、ＦｃγＲＩＩＩａをコードするＤＮＡを導入したトランスジェニック非ヒト動物を飼育し、ＦｃγＲＩＩＩａを該動物中に生成・蓄積させ、該動物中よりＦｃγＲＩＩＩａを採取することにより、ＦｃγＲＩＩＩａを製造することができる。該動物中の生成蓄積場所としては、例えば、該動物のミルク（特開昭６３－３０９１９２）、卵等をあげることができる。この際に用いられるプロモーターとしては、動物で発現できるものであればいずれも用いることができるが、例えば、乳腺細胞特異的なプロモーターであるαカゼインプロモーター、βカゼインプロモーター、βラクトグロブリンプロモーター、ホエー酸性プロテインプロモーター等が好適に用いられる。
植物個体を用いてＦｃγＲＩＩＩａを製造する方法としては、例えばＦｃγＲをコードするＤＮＡを導入したトランスジェニック植物を公知の方法［組織培養，２０（１９９４）；組織培養，２１（１９９５）；トレンド・イン・バイオテクノロジー（Ｔｒｅｎｄｓ ｉｎ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ），１５，４５（１９９７）］に準じて栽培し、ＦｃγＲＩＩＩａを該植物中に生成・蓄積させ、該植物中より該ＦｃγＲを採取することにより、ＦｃγＲＩＩＩａを生産する方法があげられる。
ＦｃγＲＩＩＩａをコードする遺伝子を導入した形質転換体により製造されたＦｃγＲＩＩＩａは、例えばＦｃγＲＩＩＩａが、細胞内に溶解状態で発現した場合には、培養終了後、細胞を遠心分離により回収し、水系緩衝液にけん濁後、超音波破砕機、フレンチプレス、マントンガウリンホモゲナイザー、ダイノミル等により細胞を破砕し、無細胞抽出液を得る。該無細胞抽出液を遠心分離することにより得られる上清から、通常の酵素の単離精製法、即ち、溶媒抽出法、硫安等による塩析法、脱塩法、有機溶媒による沈殿法、ＤＥＡＥ－セファロース、ＤＩＡＩＯＮ ＨＰＡ－７５（三菱化学（株）製）等レジンを用いた陰イオン交換クロマトグラフィー法、Ｓ－Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ ＦＦ（Ｐｈａｒｍａｃｉａ社製）等のレジンを用いた陽イオン交換クロマトグラフィー法、ブチルセファロース、フェニルセファロース等のレジンを用いた疎水性クロマトグラフィー法、分子篩を用いたゲルろ過法、アフィニティークロマトグラフィー法、クロマトフォーカシング法、等電点電気泳動等の電気泳動法等の手法を単独あるいは組み合わせて用い、ＦｃγＲＩＩＩａの精製標品を得ることができる。
また、ＦｃγＲＩＩＩａが細胞内に不溶体を形成して発現した場合は、同様に細胞を回収後破砕し、遠心分離を行うことにより、沈殿画分としてＦｃγＲＩＩＩａの不溶体を回収する。回収したＦｃγＲＩＩＩａの不溶体を蛋白質変性剤で可溶化する。該可溶化液を希釈または透析することにより、該ＦｃγＲＩＩＩａを正常な立体構造に戻した後、上記と同様の単離精製法により該ＦｃγＲＩＩＩａの精製標品を得ることができる。
ＦｃγＲＩＩＩａが細胞外に分泌された場合には、培養上清に該ＦｃγＲＩＩＩａあるい

はその誘導体を回収することができる。即ち、該培養物を上記と同様の遠心分離等の手法により処理することにより可溶性画分を取得し、該可溶性画分から、上記と同様の単離精製法を用いることにより、ＦｃγＲＩＩＩａの精製標品を得ることができる。

（２）ＦｃγＲＩＩＩａに対する結合活性の測定

細胞膜上に発現しているＦｃγＲＩＩＩａに対する抗体組成物の結合活性は、蛍光抗体法［キャンサー・イムノロジー・イムノセラピー（Ｃａｎｃｅｒ Ｉｍｍｕｎｏｌ．Ｉｍｍｕｎｏｔｈｅｒ．），３６，３７３（１９９３）］などにより測定することができる。また、前記４の（１）項に記載の方法により調製した精製ＦｃγＲＩＩＩａに対する結合活性は、文献［モノクローナル・アンティボディズ：プリンシプルズ・アンド・アプリケーションズ（Ｍｏｎｏｃｌｏｎａｌ Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ：Ｐｒｉｎｃｉｐｌｅｓ ａｎｄ Ａｐｐｌｉｃａｔｉｏｎｓ），Ｗｉｌｅｙ－Ｌｉｓｓ，Ｉｎｃ．，（１９９５）；酵素免疫測定法，第３版，医学書院（１９８７）；改訂版，酵素抗体法，学際企画（１９８５）］等に記載のウエスタン染色、ＲＩＡ（Ｒａｄｉｏｉｍｍｕｎｏａｓｓａｙ）、ＶＩＡ（Ｖｉｒｏｉｍｍｕｎｏａｓｓａｙ）、ＥＩＡ（Ｅｎｚｙｍｏｉｍｍｕｎｏａｓｓａｙ）、ＦＩＡ（Ｆｌｕｏｒｏｉｍｍｕｎｏａｓｓａｙ）、ＭＩＡ（Ｍｅｔａｌｌｏｉｍｍｕｎｏａｓｓａｙ）などの免疫学的定量方法に準じて、例えば、以下のように行うことができる。

ＥＩＡ用のプラスティックプレートにＦｃγＲＩＩＩａを固定化する。抗体組成物を含む試料反応させる。次に、適当な二次抗体を用いて結合した抗体組成物の量を測定する。

また、精製ＦｃγＲＩＩＩａに対する結合活性は、バイオセンサー［例えば、ＢＩＡｃｏｒｅ（ＢＩＡＣＯＲＥ社製）］を用いた測定［ジャーナル・オブ・イムノロジカル・メソッズ（Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．Ｍｅｔｈｏｄｓ），２００，１２１（１９９７）］やＩｓｏｔｈｅｒｍａｌ Ｔｉｔｒａｔｉｏｎ Ｃａｌｏｒｉｍｅｔｒｙ法［プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス（Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．Ｕ．Ｓ．Ａ．），９７，９０２６（２０００）］等によっても測定できる。

５．抗体組成物の活性評価

精製した抗体組成物の蛋白量、抗原との結合活性、ＦｃγＲＩＩＩａとの結合活性、エフェクター機能を測定する方法としては、モノクローナルアンチボディズ、あるいはアンチボディエンジニアリング等に記載の公知の方法を用いることができる。

その具体的な例としては、抗体組成物がヒト化抗体の場合、抗原との結合活性、抗原陽性培養細胞株に対する結合活性およびＦｃγＲＩＩＩａとの結合活性は、ＥＬＩＳＡ法および蛍光抗体法［キャンサー・イムノロジー・イムノセラピー（Ｃａｎｃｅｒ Ｉｍｍｕｎｏｌ．Ｉｍｍｕｎｏｔｈｅｒ．），３６，３７３（１９９３）］、バイオセンサー［例えば、ＢＩＡｃｏｒｅ（ＢＩＡＣＯＲＥ社製）］を用いた測定［ジャーナル・オブ・イムノロジカル・メソッズ（Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．Ｍｅｔｈｏｄｓ），２００，１２１（１９９７）］、Ｉｓｏｔｈｅｒｍａｌ Ｔｉｔｒａｔｉｏｎ Ｃａｌｏｒｉｍｅｔｒｙ法［プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス（Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．Ｕ．Ｓ．Ａ．），９７，９０２６（２０００）］等により測定できる。エフェクター機能のうち、例えば、抗原陽性培養細胞株に対する細胞障害活性は、ＣＤＣ活性、ＡＤＣＣ活性等を測定することにより、評価することができる［キャンサー・イムノロジー・イムノセラピー（Ｃａｎｃｅｒ Ｉｍｍｕｎｏｌ．Ｉｍｍｕｎｏｔｈｅｒ．），３６，３７３（１９９３）］。

６．各種細胞で発現させた抗体分子の糖鎖の分析

各種細胞で発現させた抗体分子の糖鎖構造は、通常の糖蛋白質の糖鎖構造の解析に準じて行うことができる。例えば、ＩｇＧ分子に結合している糖鎖はガラクトース、マンノース、フコースなどの中性糖、Ｎ－アセチルグルコサミンなどのアミノ糖、シアル酸などの酸性糖から構成されており、糖組成分析および二次元糖鎖マップ法などを用いた糖鎖構造解析等の手法を用いて行うことができる。

（１）中性糖・アミノ糖組成分析

抗体分子の糖鎖の組成分析は、トリフルオロ酢酸等で、糖鎖の酸加水分解を行うことによ

り、中性糖またはアミノ糖を遊離し、その組成比を分析することができる。
具体的な方法として、Ｄｉｏｎｅｘ社製糖組成分析装置（ＢｉｏＬＣ）を用いる方法があげられる。ＢｉｏＬＣはＨＰＡＥＣ－ＰＡＤ（ｈｉｇｈ ｐｅｒｆｏｒｍａｎｃｅ ａｎｉｏｎ－ｅｘｃｈａｎｇｅｃｈｒｏｍａｔｏｇｒａｐｈｙ－ｐｕｌｓｅｄ ａｍｐｅｒｏｍｅｔｒｉｃ ｄｅｔｅｃｔｉｏｎ）法［ジャーナル・オブ・リキッド・クロマトグラフィー（Ｊ．Ｌｉｑ．Ｃｈｒｏｍａｔｏｇｒ．），６，１５７７（１９８３）］によって糖組成を分析する装置である。
また、２－アミノピリジンによる蛍光標識化法でも組成比を分析することができる。具体的には、公知の方法［アグリカルチュラル・アンド・バイオロジカル・ケミストリー（Ａｇｒｕｃ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．），５５，２８３（１９９１）］に従って酸加水分解した試料を２－アミノピリジル化で蛍光ラベル化し、ＨＰＬＣ分析して組成比を算出することができる。
（２）糖鎖構造解析
抗体分子の糖鎖の構造解析は、２次元糖鎖マップ法［アナリティカル・バイオケミストリー（Ａｎａｌ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．），１７１，７３（１９８８）、生物化学実験法２３－糖タンパク質糖鎖研究法（学会出版センター）高橋禮子編（１９８９年）］により行うことができる。２次元糖鎖マップ法は、例えば、Ｘ軸には逆相クロマトグラフィー糖鎖の保持時間または溶出位置を、Ｙ軸には順相クロマトグラフィーによる糖鎖の保持時間または溶出位置を、それぞれプロットし、既知糖鎖のそれらの結果と比較することにより、糖鎖構造を推定する方法である。
具体的には、抗体をヒドラジン分解して、抗体から糖鎖を遊離し、２－アミノピリジン（以下、ＰＡと略記する）による糖鎖の蛍光標識［ジャーナル・オブ・バイオケミストリー（Ｊ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．），９５，１９７（１９８４）］を行った後、ゲルろ過により糖鎖を過剰のＰＡ化試薬などと分離し、逆相クロマトグラフィーを行う。次いで、分取した糖鎖の各ピークについて順相クロマトグラフィーを行う。これらの結果をもとに、２次元糖鎖マップ上にプロットし、糖鎖スタンダード（ＴａＫａＲａ社製）、文献［アナリティカル・バイオケミストリー（Ａｎａｌ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．），１７１，７３（１９８８）］とのスポットの比較より糖鎖構造を推定することができる。
さらに各糖鎖のＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ－ＭＳなどの質量分析を行い、２次元糖鎖マップ法により推定される構造を確認することができる。
７．抗体分子の糖鎖構造を識別する免疫学的定量方法
抗体組成物は、抗体のＦｃ領域に結合する糖鎖構造が異なった抗体分子から構成されている。Ｆｃ領域に結合する全Ｎ－グリコシド結合複合型糖鎖のうち、糖鎖還元末端のＮ－アセチルグルコサミンにフコースが結合していない糖鎖を有する抗体組成物は、前記６項に記載の抗体分子の糖鎖構造の分析法を用いることにより識別できる。また、レクチンを用いた免疫学的定量方法を用いることによっても識別できる。
レクチンを用いた免疫学的定量方法を用いた抗体分子の糖鎖構造の識別は、文献［モノクローナル・アンティボディズ：プリンシプルズ・アンド・アプリケーションズ（Ｍｏｎｏｃｌｏｎａｌ Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ：Ｐｒｉｎｃｉｐｌｅｓ ａｎｄ Ａｐｐｌｉｃａｔｉｏｎｓ），Ｗｉｌｅｙ－Ｌｉｓｓ，Ｉｎｃ．（１９９５）；酵素免疫測定法，第３版，医学書院（１９８７）；改訂版，酵素抗体法，学際企画（１９８５）］等に記載のウエスタン染色、ＲＩＡ（Ｒａｄｉｏｉｍｍｕｎｏａｓｓａｙ）、ＶＩＡ（Ｖｉｒｏｉｍｍｕｎｏａｓｓａｙ）、ＥＩＡ（Ｅｎｚｙｍｏｉｍｍｕｎｏａｓｓａｙ）、ＦＩＡ（Ｆｌｕｏｒｏｉｍｍｕｎｏａｓｓａｙ）、ＭＩＡ（Ｍｅｔａｌｌｏｉｍｍｕｎｏａｓｓａｙ）などの免疫学的定量方法に準じて、例えば、以下のように行うことができる。
抗体組成物を構成する抗体分子の糖鎖構造を認識するレクチンを標識し、標識したレクチンと試料である抗体組成物を反応させる。次に、標識したレクチンと抗体分子の複合体の量を測定する。
抗体分子の糖鎖構造を識別に用いられるレクチンとしては、例えば、ＷＧＡ（Ｔ．ｖｕｌｇａｒｉｓ由来のｗｈｅａｔ－ｇｅｒｍ ａｇｇｌｕｔｉｎｉｎ）、ＣｏｎＡ（Ｃ．ｅｎ

siformis由来のconcanavalin A）、RIC（R. communis由来の毒素）、L－PHA（P. vulgaris由来のleukoagglutinin）、LCA（L. culinaris由来のlentil agglutinin）、PSA（P. sativum由来のPea lectin）、AAL（Aleuria aurantia Lectin）、ACL（Amaranthuscaudatus Lectin）、BPL（Bauhinia purpurea Lectin）、DSL（Datura stramonium Lectin）、DBA（Dolichos biflorus Agglutinin）、EBL（Elderberry Balk Lectin）、ECL（Erythrina cristagalli Lectin）、EEL（Euonymus europaeus Lectin）、GNL（Galanthus nivalis Lectin）、GSL（Griffonia simplicifolia Lectin）、HPA（Helix pomatia Agglutinin）、HHL（Hippeastrum Hybrid Lectin）、Jacalin、LTL（Lotus tetragonolobus Lectin）、LEL（Lycopersicon esculentum Lectin）、MAL（Maackia amurensis Lectin）、MPL（Maclura pomifera Lectin）、NPL（Narcissus pseudon arcissus Lectin）、PNA（Peanut Agglutinin）、E－PHA（Phaseolusvulgaris Erythroagglutinin）、PTL（Psophocarpus tetragonolobus Lectin）、RCA（Ricinus communis Agglutinin）、STL（Solanum tuberosum Lectin）、SJA（Sophora japonica Agglutinin）、SBA（Soybean Agglutinin）、UEA（Ulexeuropaeus Agglutinin）、VVL（Vicia villosa Lectin）、WFA（Wisteriafloribunda Agglutinin）があげられる。

N－グルコシド結合複合型糖鎖還元末端のN－アセチルグルコサミンにフコースが結合している糖鎖構造を特異的に認識するレクチンを用いることが好ましく、その具体的な例としては、レンズマメレクチンLCA（Lens Culinaris由来のLentil Agglutinin）エンドウマメレクチンPSA（Pisum sativum由来のPea Lectin）、ソラマメレクチンVFA（Vicia faba由来のAgglutinin）、ヒイロチャワンタケレクチンAAL（Aleuria aurantia由来のLectin）をあげることができる。

8．抗体組成物のFcγRIIIaに対する結合活性を測定する方法

本発明は、抗原と被験抗体組成物とを反応させた後に、抗原と抗体組成物との複合体をFcγRIIIaとを接触させることを特徴とする測定方法を用いて、抗体組成物の糖鎖還元末端のN－アセチルグルコサミンにフコースが結合していない糖鎖の割合を検出すること、さらに抗体依存性細胞障害活性を検出することに関する。

以下に、本発明で用いる測定方法について詳細に説明する。

抗原をプレートに固定し、被験抗体組成物を反応させる。抗原抗体反応した複合体に、ヒトFcγRIIIaを反応させる。

反応させるヒトFcγRIIIaに酵素、放射性同位元素、蛍光などの標識体を付して抗原に結合した抗体との結合活性を免疫学的測定法により測定することができる。

免疫学的測定法としては、イムノアッセイ法、イムノブロッティング法、凝集反応、補体結合反応、溶血反応、沈降反応、金コロイド法、クロマトグラフィー法、免疫染色法など抗原抗体反応を利用した方法であればいかなるものも包含されるが、好ましくはイムノアッセイ法があげられる。

また、ヒトFcγRIIIaをコードする遺伝子に短いペプチドをコードする塩基配列を連結させて遺伝子工学的に発現させることにより、タグの入ったヒトFcγRIIIaを取得することができる。タグとしては、ヒスチジンなどがあげられる。

したがって、タグ入りのヒトＦｃγＲＩＩＩａを用いて上記の反応を行った場合には、反応後にタグに対する抗体を反応させ、タグに対する抗体に上記のような標識を施すか、またはタグに対する抗体に結合する標識抗体を用いることにより、感度の高いイムノアッセイ法を行うことができる。

本発明の検出法は、抗原と被験抗体組成物とを反応させずに、被験抗体組成物を直接Ｆｃγ ＲＩＩＩａと接触させて行うこともできる。例えば、タグに対する抗体を固相化し、タグ入りのヒトＦｃγＲＩＩＩａと反応させた後に被験抗体組成物を反応させて、ヒトＦｃ領域を認識する標識抗体で検出することができる。

抗体組成物の糖鎖還元末端のＮ－アセチルグルコサミンにフコースが結合していない糖鎖の割合を検出する方法としては、以下の方法で行う。

最初に、ある抗体組成物について糖鎖分析を行い、検量線を引くために必要な数だけ糖鎖還元末端のＮ－アセチルグルコサミンにフコースが結合していない糖鎖の割合の異なる抗体組成物（スタンダード）を用意する。その際に用いる抗体組成物の濃度は予め一定にする。用意した抗体組成物のサンプルについて上記測定方法を用いて、ＦｃγＲＩＩＩａに対する結合活性をそれぞれ測定し、糖鎖の割合とＦｃγＲＩＩＩａに対する結合活性との検量線を作成する。

以上の検量線を用いることにより、測定したいサンプルの抗体組成物の濃度を一定にして上記と同様の測定方法を用いて、ＦｃγＲＩＩＩａに対する結合活性を測定することにより、サンプルの抗体組成物の糖鎖還元末端のＮ－アセチルグルコサミンにフコースが結合していない糖鎖の割合を求めることができる。

さらにＡＤＣＣ活性を検出するためには、以下の方法で行う。

上述の抗体組成物の糖鎖還元末端のＮ－アセチルグルコサミンにフコースが結合していない糖鎖の割合を検出する方法で用いた検量線を作成するために用いたスタンダードについてＡＤＣＣ活性を測定する。測定方法としては、後述のＡＤＣＣ測定方法を用いる。用意した抗体組成物のサンプルについて上記測定方法を用いて、ＦｃγＲＩＩＩａに対する結合活性をそれぞれ測定し、ＡＤＣＣ活性とＦｃγＲＩＩＩａに対する結合活性との検量線を作成する。

以上の検量線を用いることにより、測定したいサンプルの抗体組成物の濃度を一定にして上記と同様の測定方法を用いて、ＦｃγＲＩＩＩａに対する結合活性を測定することにより、ＡＤＣＣ活性を求めることができる。

８．抗体組成物のスクリーニング方法

本発明は、抗原と被験抗体とを反応させた後に、ＦｃγＲＩＩＩａとを接触させることを特徴とする、ＦｃγＲＩＩＩａに対する結合活性の高い抗体組成物をスクリーニングする方法に関する。

以下に、本発明のスクリーニング方法について詳細に説明する。

抗原をプレートに固定し、被験抗体を反応させる。抗原抗体反応した複合体に、ヒトＦｃγＲＩＩＩａを反応させる。

反応させるヒトＦｃγＲＩＩＩａに酵素、放射性同位元素、蛍光などの標識体を付して抗原に結合した抗体との結合活性を免疫学的測定法により測定することができる。

免疫学的測定法としては、イムノアッセイ法、イムノブロッティング法、凝集反応、補体結合反応、溶血反応、沈降反応、金コロイド法、クロマトグラフィー法、免疫染色法など抗原抗体反応を利用した方法であればいかなるものも包含されるが、好ましくはイムノアッセイ法があげられる。

また、ヒトＦｃγＲＩＩＩａをコードする遺伝子に短いペプチドをコードする塩基配列を連結させて遺伝子工学的に発現させることにより、タグの入ったヒトＦｃγＲＩＩＩａを取得することができる。タグとしては、ヒスチジンなどがあげられる。

したがって、タグ入りのヒトＦｃγＲＩＩＩａを用いて上記の反応を行った場合には、反応後にタグに対する抗体を反応させ、タグに対する抗体に上記のような標識を施すか、またはタグに対する抗体に結合する標識抗体を用いることにより、感度の高いイムノアッセイ法を行うことができる。

１０．本発明の抗体組成物の利用

本発明のスクリーニング方法で得られた抗体組成物は高いＡＤＣＣ活性を有する。高いＡＤＣＣ活性を有する抗体は、癌、炎症疾患、自己免疫疾患、アレルギーなどの免疫疾患、循環器疾患、またはウィルスあるいは細菌感染をはじめとする各種疾患の予防および治療において有用である。

癌、すなわち悪性腫瘍は癌細胞が増殖する。通常の抗癌剤は癌細胞の増殖を抑制することを特徴とする。しかし、高いＡＤＣＣ活性を有する抗体は、殺細胞効果により癌細胞を障害することにより癌を治療することができるため、通常の抗癌剤よりも治療薬として有効である。特に癌の治療薬において、現状では抗体医薬単独の抗腫瘍効果は不充分であり、化学療法との併用療法が行われているが［サイエンス（Ｓｃｉｅｎｃｅ），２８０，１１９７（１９９８）］、本発明の方法で得られた抗体組成物単独でのより強い抗腫瘍効果が認められれば、化学療法に対する依存度が低くなり、副作用の低減にもなる。

炎症疾患、自己免疫疾患、アレルギーなどの免疫疾患において、それらの疾患における生体内反応は、免疫細胞によるメディエータ分子の放出により惹起されるため、高いＡＤＣＣ活性を有する抗体を用いて免疫細胞を除去することにより、アレルギー反応を抑えることができる。

循環器疾患としては、動脈硬化などがあげられる。動脈硬化は、現在バルーンカテーテルによる治療を行うが、治療後の再狭窄での動脈細胞の増殖を高いＡＤＣＣ活性を有する抗体を用いて抑えることより、循環器疾患を予防および治療することができる。

ウィルスまたは細菌に感染細胞を、高いＡＤＣＣ活性を有する抗体を用いてウィルスまたは細菌に感染細胞の増殖を抑えることにより、ウィルスまたは細菌感染をはじめとする各種疾患の予防および治療することができる。

腫瘍関連抗原を認識する抗体、アレルギーあるいは炎症に関連する抗原を認識する抗体、循環器疾患に関連する抗原を認識する抗体、またはウイルスあるいは細菌感染に関連する抗原を認識する抗体の具体例を以下に述べる。。

腫瘍関連抗原を認識する抗体としては、抗ＧＤ２抗体［アンチ・キャンサー・リサーチ（Ａｎｔｉｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ．），１３，３３１（１９９３）］、抗ＧＤ３抗体［キャンサー・イムノロジー・イムノセラピー（Ｃａｎｃｅｒ Ｉｍｍｕｎｏｌ．Ｉｍｍｕｎｏｔｈｅｒ．），３６，２６０（１９９３）］、抗ＧＭ２抗体［キャンサー・リサーチ（Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ．），５４，１５１１（１９９４）］、抗ＨＥＲ２抗体［プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス（Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ），８９，４２８５（１９９２）］、抗ＣＤ５２抗体［プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス（Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ），８９，４２８５（１９９２）］、抗ＭＡＧＥ抗体［ブリティッシュ・ジャーナル・オブ・キャンサー（Ｂｒｉｔｉｓｈ Ｊ．Ｃａｎｃｅｒ），８３，４９３（２０００）］、抗１．２４抗体［モレキュラー・イムノロジー（Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｉｍｍｕｎｏｌ．），３６，３８７（１９９９）］、抗副甲状腺ホルモン関連蛋白（ＰＴＨｒＰ）抗体［キャンサー（Ｃａｎｃｅｒ），８８，２９０９（２０００）］、抗塩基性線維芽細胞増殖因子抗体、抗線維芽細胞増殖因子８抗体［プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス（Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ），８６，９９１１（１９８９）］、抗塩基性繊維芽細胞増殖因子受容体抗体、抗線維芽細胞増殖因子８受容体抗体［ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー（Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．），２６５，１６４５５（１９９０）］、抗インスリン様増殖因子抗体［ジャーナル・オブ・ニューロサイエンス・リサーチ（Ｊ．Ｎｅｕｒｏｓｃｉ．Ｒｅｓ．），４０，６４７（１９９５）］、抗インスリン様増殖因子受容体抗体［ジャーナル・オブ・ニューロサイエンス・リサーチ（Ｊ．Ｎｅｕｒｏｓｃｉ．Ｒｅｓ．），４０，６４７（１９９５）］、抗ＰＭＳＡ抗体［ジャーナル・オブ・ウロロジー（Ｊ．Ｕｒｏｌｏｇｙ），１６０，２３９６（１９９８）］、抗血管内皮細胞増殖因子抗体［キャンサー・リサーチ（Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ．），５７，４５９３（１９９７）］、抗血管内皮細胞増殖因子受容体抗体［オンコジーン（Ｏｎｃｏｇｅｎｅ），１９

，２１３８（２０００）］などがあげられる。
アレルギーあるいは炎症に関連する抗原を認識する抗体としては、抗インターロイキン６抗体［イムノロジカル・レビューズ（Ｉｍｍｕｎｏｌ．Ｒｅｖ．），１２７，５（１９９２）］、抗インターロイキン６受容体抗体［モレキュラー・イムノロジー（Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｉｍｍｕｎｏｌ．），３１，３７１（１９９４）］、抗インターロイキン５抗体［イムノロジカル・レビューズ（Ｉｍｍｕｎｏｌ．Ｒｅｖ．），１２７，５（１９９２）］、抗インターロイキン５受容体抗体、抗インターロイキン４抗体［サイトカイン（Ｃｙｔｏｋｉｎｅ），３，５６２（１９９１）］、抗インターロイキン４受容体抗体［ジャーナル・オブ・イムノロジカル・メソッズ（Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．Ｍｅｔｈｏｄｓ），２１７，４１（１９９８）］、抗腫瘍壊死因子抗体［ハイブリドーマ（Ｈｙｂｒｉｄｏｍａ），１３，１８３（１９９４）］、抗腫瘍壊死因子受容体抗体［モレキュラー・ファーマコロジー（Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｐｈａｒｍａｃｏｌ．），５８，２３７（２０００）］、抗ＣＣＲ４抗体［ネイチャー（Ｎａｔｕｒｅ），４００，７７６，（１９９９）］、抗ケモカイン抗体［Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．Ｍｅｔｈ．，１７４，２４９－２５７（１９９４）］または抗ケモカイン受容体抗体［ジャーナル・オブ・イムノロジカル・メソッズ（Ｊ．Ｅｘｐ．Ｍｅｄ．），１８６，１３７３（１９９７）］であり、循環器疾患に関連する抗原を認識する抗体が抗ＧＰＩＩｂ／ＩＩＩａ抗体［ジャーナル・オブ・イムノロジー（Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．），１５２，２９６８（１９９４）］、抗血小板由来増殖因子抗体［サイエンス（Ｓｃｉｅｎｃｅ），２５３，１１２９（１９９１）］、抗血小板由来増殖因子受容体抗体［ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー（Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．），２７２，１７４００（１９９７）］、抗血液凝固因子抗体［サーキュレーション（Ｃｉｒｃｕｌａｔｉｏｎ），１０１，１１５８（２０００）］などがあげられる。
ウイルスあるいは細菌感染に関連する抗原を認識する抗体としては、抗ｇｐ１２０抗体［ストラクチャー（Ｓｔｒｕｃｔｕｒｅ），８，３８５（２０００）］、抗ＣＤ４抗体［ジャーナル・オブ・リューマトロジー（Ｊ．Ｒｈｅｕｍａｔｏｌｏｇｙ），２５，２０６５（１９９８）］、抗ＣＣＲ５抗体、抗ベロ毒素抗体［ジャーナル・オブ・クリニカル・マイクロバイオロジー（Ｊ．Ｃｌｉｎ．Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ．），３７，３９６（１９９９）］などがあげられる。
上記抗体は、ＡＴＣＣ（Ｔｈｅ Ａｍｅｒｉｃａｎ Ｔｙｐｅ Ｃｕｌｔｕｒｅ Ｃｏｌｌｅｃｔｉｏｎ）、理化学研究所細胞開発銀行、独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センター等の公的な機関、あるいは大日本製薬株式会社、Ｒ＆Ｄ ＳＹＳＴＥＭＳ社、ＰｈａｒＭｉｎｇｅｎ社、コスモバイオ社、フナコシ株式会社等の民間試薬販売会社からも入手することができる。
本発明の方法で得られた抗体組成物は、種々の疾患治療薬として単独で投与することも可能ではあるが、通常は薬理学的に許容される一つあるいはそれ以上の担体と一緒に混合し、製剤学の技術分野においてよく知られる任意の方法により製造した医薬製剤として提供するのが望ましい。
投与経路は、治療に際して最も効果的なものを使用するのが望ましく、経口投与、または口腔内、気道内、直腸内、皮下、筋肉内および静脈内等の非経口投与をあげることができ、抗体製剤の場合、望ましくは静脈内投与をあげることができる。
投与形態としては、噴霧剤、カプセル剤、錠剤、顆粒剤、シロップ剤、乳剤、座剤、注射剤、軟膏、テープ剤等があげられる。
経口投与に適当な製剤としては、乳剤、シロップ剤、カプセル剤、錠剤、散剤、顆粒剤等があげられる。
乳剤およびシロップ剤のような液体調製物は、水、ショ糖、ソルビトール、果糖等の糖類、ポリエチレングリコール、プロピレングリコール等のグリコール類、ごま油、オリーブ油、大豆油等の油類、ｐ－ヒドロキシ安息香酸エステル類等の防腐剤、ストロベリーフレーバー、ペパーミント等のフレーバー類等を添加剤として用いて製造できる。
カプセル剤、錠剤、散剤、顆粒剤等は、乳糖、ブドウ糖、ショ糖、マンニトール等の賦形剤、デンプン、アルギン酸ナトリウム等の崩壊剤、ステアリン酸マグネシウム、タルク等

の滑沢剤、ポリビニルアルコール、ヒドロキシプロピルセルロース、ゼラチン等の結合剤、脂肪酸エステル等の界面活性剤、グリセリン等の可塑剤等を添加剤として用いて製造できる。
非経口投与に適当な製剤としては、注射剤、座剤、噴霧剤等があげられる。
注射剤は、塩溶液、ブドウ糖溶液、あるいは両者の混合物からなる担体等を用いて調製される。または、抗体組成物を常法に従って凍結乾燥し、これに塩化ナトリウムを加えることによって粉末注射剤を調製することもできる。
座剤はカカオ脂、水素化脂肪またはカルボン酸等の担体を用いて調製される。
また、噴霧剤は該抗体組成物そのもの、ないしは受容者の口腔および気道粘膜を刺激せず、かつ該抗体組成物を微細な粒子として分散させ吸収を容易にさせる担体等を用いて調製される。
担体として具体的には乳糖、グリセリン等が例示される。該抗体組成物および用いる担体の性質により、エアロゾル、ドライパウダー等の製剤が可能である。また、これらの非経口剤においても経口剤で添加剤として例示した成分を添加することもできる。
投与量または投与回数は、目的とする治療効果、投与方法、治療期間、年齢、体重等により異なるが、有効成分の量として、通常成人１日当たり１０μｇ／ｋｇ～２０ｍｇ／ｋｇである。
また、抗体組成物の各種腫瘍細胞に対する抗腫瘍効果を検討する方法は、インビトロ実験としては、ＣＤＣ活性測定法、ＡＤＣＣ活性測定法等があげられ、インビボ実験としては、マウス等の実験動物での腫瘍系を用いた抗腫瘍実験等があげられる。
ＣＤＣ活性、ＡＤＣＣ活性、抗腫瘍実験は、文献［キャンサー・イムノロジー・イムノセラピー（Ｃａｎｃｅｒ Ｉｍｍｕｎｏｌ．Ｉｍｍｕｎｏｔｈｅｒ．），３６，３７３（１９９３）；キャンサー・リサーチ（Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓｅａｒｃｈ），５４，１５１１（１９９４）］等記載の方法に従って行うことができる。
以下の実施例により本発明をより具体的に説明するが、実施例は本発明の単なる例示を示すものにすぎず、本発明の範囲を限定するものではない
発明を実施するための最良の形態
実施例１．抗ガングリオシドＧＤ３ヒト型キメラ抗体の作製
１．抗ガングリオシドＧＤ３ヒト型キメラ抗体のタンデム型発現ベクターｐＣｈｉ６４１ＬＨＧＭ４の構築
抗ガングリオシドＧＤ３ヒト型キメラ抗体（以下、抗ＧＤ３キメラ抗体と表記する）のＬ鎖の発現ベクターｐＣｈｉ６４１ＬＧＭ４［ジャーナル・オブ・イムノロジカル・メソッズ（Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．Ｍｅｔｈｏｄｓ），１６７，２７１（１９９４）］を制限酵素ＭｌｕＩ（宝酒造社製）とＳａｌＩ（宝酒造社製）で切断して得られるＬ鎖ｃＤＮＡを含む約４．０３ｋｂの断片と動物細胞用発現ベクターｐＡＧＥ１０７［サイトテクノロジー（Ｃｙｔｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ），３，１３３（１９９０）］を制限酵素ＭｌｕＩ（宝酒造社製）とＳａｌＩ（宝酒造社製）で切断して得られるＧ４１８耐性遺伝子およびスプライシングシグナルを含む約３．４０ｋｂの断片をＤＮＡ Ｌｉｇａｔｉｏｎ Ｋｉｔ（宝酒造社製）を用いて連結、大腸菌ＨＢ１０１株（モレキュラー・クローニング第２版）を形質転換してプラスミドｐＣｈｉ６４１ＬＧＭ４０を構築した。
次に、上記で構築したプラスミドｐＣｈｉ６４１ＬＧＭ４０を制限酵素ＣｌａＩ（宝酒造社製）で切断後、ＤＮＡ Ｂｌｕｎｔｉｎｇ Ｋｉｔ（宝酒造社製）を用いて平滑末端化し、更にＭｌｕＩ（宝酒造社製）で切断して得られるＬ鎖ｃＤＮＡを含む約５．６８ｋｂの断片と抗ＧＤ３キメラ抗体のＨ鎖の発現ベクターｐＣｈｉ６４１ＨＧＭ４［ジャーナル・オブ・イムノロジカル・メソッズ（Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．Ｍｅｔｈｏｄｓ），１６７，２７１（１９９４）］を制限酵素ＸｈｏＩ（宝酒造社製）で切断後、ＤＮＡ Ｂｌｕｎｔｉｎｇ Ｋｉｔ（宝酒造社製）を用いて平滑末端化し、更にＭｌｕＩ（宝酒造社製）で切断して得られるＨ鎖ｃＤＮＡを含む約８．４０ｋｂの断片をＤＮＡ Ｌｉｇａｔｉｏｎ Ｋｉｔ（宝酒造社製）を用いて連結、大腸菌ＨＢ１０１株（モレキュラー・クローニング第２版）を形質転換して抗ＧＤ３キメラ抗体のタンデム型発現ベクターｐＣｈｉ６４１ＬＨ

ＧＭ４を構築した。
２．抗ＧＤ３キメラ抗体の安定生産細胞の作製
上記実施例１の１項で構築した抗ＧＤ３キメラ抗体のタンデム型発現ベクターｐＣｈｉ６４１ＬＨＧＭ４を各種細胞株に導入し、優良株を選択することで抗ＧＤ３キメラ抗体の安定生産細胞を以下のようにして作製した。
（１）ラットミエローマＹＢ２／０細胞を用いた生産細胞の作製
抗ＧＤ３キメラ抗体発現ベクターｐＣｈｉ６４１ＬＨＧＭ４の５μｇを４×１０^{6}細胞のラットミエローマＹＢ２／０細胞［ＡＴＣＣ　ＣＲＬ－１６６２、ジャーナル・オブ・セルラー・バイオロジー（Ｊ．Ｃｅｌｌ．Ｂｉｏｌ．），９３，５７６（１９８２）］へエレクトロポレーション法［サイトテクノロジー（Ｃｙｔｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ），３，１３３（１９９０）］により導入後、４０ｍＬのＲＰＭＩ１６４０－ＦＢＳ（１０）［１０％牛胎児血清（以下、ＦＢＳと表記する；ＧＩＢＣＯ　ＢＲＬ社製）を含むＲＰＭＩ１６４０培地］に懸濁し、９６ウェル培養用プレート（住友ベークライト社製）に２００μＬ／ウェルずつ分注した。５％CO_2インキュベーター内で３７℃、２４時間培養した後、Ｇ４１８を０．５ｍｇ／ｍＬになるように添加して１～２週間培養した。Ｇ４１８耐性を示す形質転換株のコロニーが出現し、増殖の認められたウェルより培養上清を回収し、上清中の抗ＧＤ３キメラ抗体の抗原結合活性を実施例１の３項に示すＥＬＩＳＡ法により測定した。
培養上清中に抗ＧＤ３キメラ抗体の生産が認められたウェルの形質転換株については、ｄｈｆｒ遺伝子増幅系を利用して抗体生産量を増加させる目的で、Ｇ４１８を０．５ｍｇ／ｍＬ、ＤＨＦＲの阻害剤であるメソトレキセート（以下、ＭＴＸと表記する；ＳＩＧＭＡ社製）を５０ｎｍｏｌ／Ｌ含むＲＰＭＩ１６４０－ＦＢＳ（１０）培地に１～２×１０^{5}細胞／ｍＬになるように懸濁し、２４ウェルプレート（Ｇｒｅｉｎｅｒ社製）に２ｍＬずつ分注した。５％CO_2インキュベーター内で３７℃で１～２週間培養して、５０ｎｍｏｌ／Ｌ　ＭＴＸ耐性を示す形質転換株を誘導した。形質転換株の増殖が認められたウェルの培養上清中の抗ＧＤ３キメラ抗体の抗原結合活性を実施例１の３項に示すＥＬＩＳＡ法により測定した。培養上清中に抗ＧＤ３キメラ抗体の生産が認められたウェルの形質転換株については、上記と同様の方法により、ＭＴＸ濃度を１００ｎｍｏｌ／Ｌ、２００ｎｍｏｌ／Ｌと順次上昇させ、最終的にＧ４１８を０．５ｍｇ／ｍＬ、ＭＴＸを２００ｎｍｏｌ／Ｌの濃度で含むＲＰＭＩ１６４０－ＦＢＳ（１０）培地で増殖可能かつ、抗ＧＤ３キメラ抗体を高生産する形質転換株を得た。得られた形質転換株の中から優良株を選択し、２回の限界希釈法による単一細胞化（クローン化）を行った。
このようにして得られた抗ＧＤ３キメラ抗体を生産する形質転換細胞クローン７－９－５１は平成１１年４月５日付で工業技術院生命工学工業技術研究所（日本国茨城県つくば市東１丁目１番３号）（現・独立行政法人産業技術総合研究所　特許生物寄託センター（日本国茨城県つくば市東１丁目１番地中央第６））にＦＥＲＭ　ＢＰ－６６９１として寄託されている。
（２）ＣＨＯ／ＤＧ４４細胞を用いた生産細胞の作製
抗ＧＤ３キメラ抗体発現ベクターｐＣｈｉ６４１ＬＨＧＭ４の４μｇを１．６×１０^{6}細胞のＣＨＯ／ＤＧ４４細胞［プロシーディング・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス（Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ），７７，４２１６（１９８０）］へエレクトロポレーション法［サイトテクノロジー（Ｃｙｔｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ），３，１３３（１９９０）］により導入後、１０ｍＬのＩＭＤＭ－ＦＢＳ（１０）－ＨＴ（１）［ＦＢＳを１０％、ＨＴ　ｓｕｐｐｌｅｍｅｎｔ（ＧＩＢＣＯ　ＢＲＬ社製）を１倍濃度で含むＩＭＤＭ培地］に懸濁し、９６ウェル培養用プレート（岩城硝子社製）に２００μＬ／ウェルずつ分注した。５％CO_2インキュベーター内で３７℃、２４時間培養した後、Ｇ４１８を０．５ｍｇ／ｍＬになるように添加して１～２週間培養した。Ｇ４１８耐性を示す形質転換株のコロニーが出現し、増殖の認められたウェルより培養上清を回収し、上清中の抗ＧＤ３キメラ抗体の抗原結合活性を実施例１の３項に示すＥＬＩＳＡ法により測定した。

培養上清中に抗ＧＤ３キメラ抗体の生産が認められたウェルの形質転換株については、ｄｈｆｒ遺伝子増幅系を利用して抗体生産量を増加させる目的で、Ｇ４１８を０．５ｍｇ／ｍＬ、ＭＴＸを１０ｎｍｏｌ／Ｌ含むＩＭＤＭ－ｄＦＢＳ（１０）培地［１０％透析牛胎児血清（以下、ｄＦＢＳと表記する；ＧＩＢＣＯ　ＢＲＬ社製）を含むＩＭＤＭ培地］に１～２×10^5細胞／ｍＬになるように懸濁し、２４ウェルプレート（岩城硝子社製）に０．５ｍＬずつ分注した。５％CO_2インキュベーター内で３７℃で１～２週間培養して、１０ｎｍｏｌ／Ｌ　ＭＴＸ耐性を示す形質転換株を誘導した。増殖が認められたウェルの形質転換株については、上記と同様の方法により、ＭＴＸ濃度を１００ｎｍｏｌ／Ｌに上昇させ、最終的にＧ４１８を０．５ｍｇ／ｍＬ、ＭＴＸを１００ｎｍｏｌ／Ｌの濃度で含むＩＭＤＭ－ｄＦＢＳ（１０）培地で増殖可能かつ、抗ＧＤ３キメラ抗体を高生産する形質転換株を得た。得られた形質転換株の中から優良株を選択し、２回の限界希釈法によるクローン化を行った。

（３）マウスミエローマＮＳＯ細胞を用いた生産細胞の作製

抗ＧＤ３キメラ抗体発現ベクターｐＣｈｉ６４１ＬＨＧＭ４の５μｇを４×10^6細胞のマウスミエローマＮＳＯ細胞へエレクトロポレーション法［サイトテクノロジー（Ｃｙｔｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ），3，１３３（１９９０）］により導入後、４０ｍＬのＥＸ－ＣＥＬＬ３０２－ＦＢＳ（１０）［１０％ＦＢＳ、２ｍｍｏｌ／Ｌ　Ｌ－グルタミン（以下、Ｌ－Ｇｌｎと表記する；ＧＩＢＣＯ　ＢＲＬ社製）を含むＥＸ－ＣＥＬＬ３０２培地］に懸濁し、９６ウェル培養用プレート（住友ベークライト社製）に２００μＬ／ウェルずつ分注した。５％CO_2インキュベーター内で３７℃、２４時間培養した後、Ｇ４１８を０．５ｍｇ／ｍＬになるように添加して１～２週間培養した。Ｇ４１８耐性を示す形質転換株のコロニーが出現し、増殖の認められたウェルより培養上清を回収し、上清中の抗ＧＤ３キメラ抗体の抗原結合活性を実施例１の３項に示すＥＬＩＳＡ法により測定した。

培養上清中に抗ＧＤ３キメラ抗体の生産が認められたウェルの形質転換株については、ｄｈｆｒ遺伝子増幅系を利用して抗体生産量を増加させる目的で、Ｇ４１８を０．５ｍｇ／ｍＬ、ＭＴＸを５０ｎｍｏｌ／Ｌ含むＥＸ－ＣＥＬＬ３０２－ｄＦＢＳ（１０）培地（１０％ｄＦＢＳ、２ｍｍｏｌ／ＬＬ－Ｇｌｎを含むＥＸ－ＣＥＬＬ３０２培地）に１～２×10^5細胞／ｍＬになるように懸濁し、２４ウェルプレート（Ｇｒｅｉｎｅｒ社製）に２ｍＬずつ分注した。５％CO_2インキュベーター内で３７℃で１～２週間培養して、５０ｎｍｏｌ／Ｌ　ＭＴＸ耐性を示す形質転換株を誘導した。形質転換株の増殖が認められたウェルの培養上清中の抗ＧＤ３キメラ抗体の抗原結合活性を実施例１の３項に示すＥＬＩＳＡ法により測定した。培養上清中に抗ＧＤ３キメラ抗体の生産が認められたウェルの形質転換株については、上記と同様の方法により、ＭＴＸ濃度を１００ｎｍｏｌ／Ｌ、２００ｎｍｏｌ／Ｌと順次上昇させ、最終的にＧ４１８を０．５ｍｇ／ｍＬ、ＭＴＸを２００ｎｍｏｌ／Ｌの濃度で含むＥＸ－ＣＥＬＬ３０２－ｄＦＢＳ（１０）培地で増殖可能かつ、抗ＧＤ３キメラ抗体を高生産する形質転換株を得た。得られた形質転換株の中から優良株を選択し、２回の限界希釈法によるクローン化を行った。

３．抗体のＧＤ３に対する結合活性の測定（ＥＬＩＳＡ法）

抗体のＧＤ３に対する結合活性は以下のようにして測定した。

４ｎｍｏｌのＧＤ３（雪印乳業社製）を１０μｇのジパルミトイルフォスファチジルコリン（ＳＩＧＭＡ社製）と５μｇのコレステロール（ＳＩＧＭＡ社製）とを含む２ｍＬのエタノール溶液に溶解した。該溶液の２０μＬ（４０ｐｍｏｌ／ウェルとなる）を９６ウェルのＥＬＩＳＡ用のプレート（Ｇｒｅｉｎｅｒ社製）の各ウェルにそれぞれ分注し、風乾後、１％牛血清アルブミン（以下、ＢＳＡと表記する；ＳＩＧＭＡ社製）を含むＰＢＳ（以下、１％ＢＳＡ－ＰＢＳと表記する）を１００μＬ／ウェルで加え、室温で１時間反応させて残存する活性基をブロックした。１％ＢＳＡ－ＰＢＳを捨て、形質転換株の培養上清或いは精製したヒト型キメラ抗体の各種希釈溶液を５０μＬ／ウェルで加え、室温で１時間反応させた。反応後、各ウェルを０．０５％Ｔｗｅｅｎ２０（和光純薬社製）を含むＰＢＳ（以下、Ｔｗｅｅｎ－ＰＢＳと表記する）で洗浄後、１％ＢＳＡ－ＰＢＳで３０００倍に希釈したペルオキシダーゼ標識ヤギ抗ヒトＩｇＧ（Ｈ＆Ｌ）抗体溶液（Ａｍｅｒｉ

ｃａｎ Ｑｕａｌｅｘ社製）を二次抗体溶液として、５０μＬ／ウェルで加え、室温で１時間反応させた。反応後、Ｔｗｅｅｎ－ＰＢＳで洗浄後、ＡＢＴＳ基質液［２，２’－アジノ－ビス（３－エチルベンゾチアゾリン－６－スルホン酸）アンモニウムの０．５５ｇを１Ｌの０．１ｍｏｌ／Ｌクエン酸緩衝液（ｐＨ４．２）に溶解し、使用直前に過酸化水素を１μＬ／ｍＬで添加した溶液（以下、同様）］を５０μＬ／ウェルで加えて発色させ、４１５ｎｍの吸光度（以下、ＯＤ４１５と表記する）を測定した。

４．抗ＧＤ３キメラ抗体の精製

（１）ＹＢ２／０細胞由来の生産細胞の培養および抗体の精製

上記実施例１の２項（１）で得られた抗ＧＤ３キメラ抗体を生産する形質転換細胞クローンをＢＳＡを０．２％、ＭＴＸを２００ｎｍｏｌ／Ｌ、トリヨードチロニン（以下、Ｔ３と表記する；ＳＩＧＭＡ社製）を１００ｎｍｏｌ／Ｌの濃度で含むＨｙｂｒｉｄｏｍａ－ＳＦＭ培地に3×10^{5}細胞／ｍＬとなるように懸濁し、２．０Ｌスピナーボトル（岩城硝子社製）を用いて５０ｒｐｍの速度で攪拌培養した。３７℃の恒温室内で１０日間培養後、培養上清を回収した。培養上清よりＰｒｏｓｅｐ－Ａ（Ｂｉｏｐｒｏｃｅｓｓｉｎｇ社製）カラムを用いて、添付の説明書に従い、抗ＧＤ３キメラ抗体を精製した。精製した抗ＧＤ３キメラ抗体は、ＹＢ２／０－ＧＤ３キメラ抗体と名付けた。

（２）ＣＨＯ／ＤＧ４４細胞由来の生産細胞の培養および抗体の精製

上記実施例１の２項（２）で得られた抗ＧＤ３キメラ抗体を生産する形質転換細胞クローンをＬ－Ｇｌｎを３ｍｍｏｌ／Ｌ、脂肪酸濃縮液（以下、ＣＤＬＣと表記する；ＧＩＢＣＯ ＢＲＬ社製）を０．５％、プルロニックＦ６８（以下、ＰＦ６８と表記する；ＧＩＢＣＯ ＢＲＬ社製）を０．３％の濃度で含むＥＸ－ＣＥＬＬ３０２培地に1×10^{6}細胞／ｍＬとなるように懸濁し、１７５mm^{2}フラスコ（Ｇｒｅｉｎｅｒ社製）に５０ｍＬずつ分注した。５％CO_{2}インキュベーター内で３７℃で４日間培養後、培養上清を回収した。培養上清よりＰｒｏｓｅｐ－Ａ（Ｂｉｏｐｒｏｃｅｓｓｉｎｇ社製）カラムを用いて、添付の説明書に従い、抗ＧＤ３キメラ抗体を精製した。精製した抗ＧＤ３キメラ抗体は、ＣＨＯ／ＤＧ４４－ＧＤ３キメラ抗体と名付けた。

（３）ＮＳＯ細胞由来の生産細胞の培養および抗体の精製

上記実施例１の２項（３）で得られた抗ＧＤ３キメラ抗体を生産する形質転換細胞クローンをＬ－Ｇｌｎを２ｍｍｏｌ／Ｌ、Ｇ４１８を０．５ｍｇ／ｍＬ、ＭＴＸを２００ｎｍｏｌ／Ｌ、ｄＦＢＳを１％の濃度で含むＥＸ－ＣＥＬＬ３０２培地に1×10^{6}細胞／ｍＬとなるように懸濁し、１７５mm^{2}フラスコ（Ｇｒｅｉｎｅｒ社製）に２００ｍＬずつ分注した。５％CO_{2}インキュベーター内で３７℃で４日間培養後、培養上清を回収した。培養上清よりＰｒｏｓｅｐ－Ａ（Ｂｉｏｐｒｏｃｅｓｓｉｎｇ社製）カラムを用いて、添付の説明書に従い、抗ＧＤ３キメラ抗体を精製した。精製した抗ＧＤ３キメラ抗体は、ＮＳＯ－ＧＤ３キメラ抗体（３０２）と名付けた。

また、該形質転換細胞クローンをＧ４１８を０．５ｍｇ／ｍＬ、ＭＴＸを２００ｎｍｏｌ／Ｌの濃度で含むＧＩＴ培地に3×10^{5}細胞／ｍＬとなるように懸濁し、１７５mm^{2}フラスコ（Ｇｒｅｉｎｅｒ社製）に２００ｍＬずつ分注した。５％CO_{2}インキュベーター内で３７℃で１０日間培養後、培養上清を回収した。培養上清よりＰｒｏｓｅｐ－Ａ（Ｂｉｏｐｒｏｃｅｓｓｉｎｇ社製）カラムを用いて、添付の説明書に従い、抗ＧＤ３キメラ抗体を精製した。精製した抗ＧＤ３キメラ抗体は、ＮＳＯ－ＧＤ３キメラ抗体（ＧＩＴ）と名付けた。

（４）ＳＰ２／０細胞由来の生産細胞の培養および抗体の精製

特開平５－３０４９８９（ＥＰ５３３１９９）に記載の抗ＧＤ３キメラ抗体を生産する形質転換細胞クローン（ＫＭ－８７１（ＦＥＲＭ ＢＰ－３５１２））をＧ４１８を０．５ｍｇ／ｍＬ、ＭＴＸを２００ｎｍｏｌ／Ｌの濃度で含むＧＩＴ培地に3×10^{5}細胞／ｍＬとなるように懸濁し、１７５mm^{2}フラスコ（Ｇｒｅｉｎｅｒ社製）に２００ｍＬずつ分注した。５％CO_{2}インキュベーター内で３７℃で８日間培養後、培養上清を回収した。培養上清よりＰｒｏｓｅｐ－Ａ（Ｂｉｏｐｒｏｃｅｓｓｉｎｇ社製）カラムを用いて、添付の説明書に従い、抗ＧＤ３キメラ抗体を精製した。精製した抗ＧＤ３キメラ抗体は、

ＳＰ２／０－ＧＤ３キメラ抗体と名付けた。

５．精製した抗ＧＤ３キメラ抗体の解析

上記実施例１の４項で得られた各種動物細胞で生産、精製した５種類の抗ＧＤ３キメラ抗体の各４μｇを公知の方法［ネイチャー（Ｎａｔｕｒｅ），２２７，６８０（１９７０）］に従ってＳＤＳ－ＰＡＧＥし、分子量および精製度を解析した。その結果を第１図に示した。第１図に示したように、精製した各抗ＧＤ３キメラ抗体は、いずれも非還元条件下では分子量が約１５０キロダルトン（以下、Ｋｄと表記する）の単一のバンドが、還元条件下では約５０Ｋｄと約２５Ｋｄの２本のバンドが認められた。これらの分子量は、抗体のＨ鎖およびＬ鎖のｃＤＮＡの塩基配列から推定される分子量（Ｈ鎖：約４９Ｋｄ、Ｌ鎖：約２３Ｋｄ、分子全体：約１４４Ｋｄ）とほぼ一致し、更に、ＩｇＧ型の抗体は、非還元条件下では分子量は約１５０Ｋｄであり、還元条件下では分子内のジスルフィド結合（以下、Ｓ－Ｓ結合と表記する）が切断され、約５０Ｋｄの分子量を持つＨ鎖と約２５Ｋｄの分子量を持つＬ鎖に分解されるという報告［アンティボディズ，Ｃｈａｐｔｅｒ１４、モノクローナル・アンティボディズ］と一致し、各抗ＧＤ３キメラ抗体が正しい構造の抗体分子として発現され、かつ精製されたことが確認された。

実施例２．抗ＧＤ３キメラ抗体の活性評価

１．抗ＧＤ３キメラ抗体のＧＤ３に対する結合活性（ＥＬＩＳＡ法）

上記実施例１の４項で得られた５種類の精製抗ＧＤ３キメラ抗体のＧＤ３に対する結合活性を実施例１の３項に示すＥＬＩＳＡ法により測定した。第２図は、添加する抗ＧＤ３キメラ抗体の濃度を変化させて結合活性を検討した結果である。第２図に示したように、５種類の抗ＧＤ３キメラ抗体は、ほぼ同等のＧＤ３に対する結合活性を示した。この結果は抗体の抗原結合活性は、抗体を生産する動物細胞やその培養方法に関わらず、一定であることを示している。また、ＮＳＯ－ＧＤ３キメラ抗体（３０２）とＮＳＯ－ＧＤ３キメラ抗体（ＧＩＴ）の比較から抗原結合活性は、培養に用いる培地にも依らず、一定であることが示唆された。

２．抗ＧＤ３キメラ抗体のＡＤＣＣ活性

上記実施例１の４項で得られた５種類の精製抗ＧＤ３キメラ抗体のＡＤＣＣ活性を以下のようにして測定した。

（１）標的細胞溶液の調製

ＲＰＭＩ１６４０－ＦＢＳ（１０）培地で培養したヒトメラノーマ細胞株Ｇ－３６１（ＡＴＣＣＣＲＬ１４２４）の1×10^{6}細胞を調製し、放射性物質である$Na_2{}^{51}CrO_4$を３．７ＭＢｑ当量加えて３７℃で１時間反応させ、細胞を放射性物質標識した。反応後、ＲＰＭＩ１６４０－ＦＢＳ（１０）培地で懸濁および遠心分離操作により３回洗浄し、培地に再懸濁し、４℃で３０分間氷中に放置して放射性物質を自然解離させた。遠心分離後、ＲＰＭＩ１６４０－ＦＢＳ（１０）培地を５ｍＬ加え、2×10^{5}細胞／ｍＬに調製し、標的細胞溶液とした。

（２）エフェクター細胞溶液の調製

健常人静脈血５０ｍＬを採取し、ヘパリンナトリウム（武田薬品社製）０．５ｍＬを加え穏やかに混ぜた。これをＬｙｍｐｈｏｐｒｅｐ（Ｎｙｃｏｍｅｄ　Ｐｈａｒｍａ　ＡＳ社製）を用いて使用説明書に従い、遠心分離して単核球層を分離した。ＲＰＭＩ１６４０－ＦＢＳ（１０）培地で３回遠心分離して洗浄後、培地を用いて2×10^{6}細胞／ｍＬの濃度で再懸濁し、エフェクター細胞溶液とした。

（３）ＡＤＣＣ活性の測定

９６ウェルＵ字底プレート（Ｆａｌｃｏｎ社製）の各ウェルに上記（１）で調製した標的細胞溶液の５０μＬ（1×10^{4}細胞／ウェル）を分注した。次いで（２）で調製したエフェクター細胞溶液を１００μＬ（2×10^{5}細胞／ウェル、エフェクター細胞と標的細胞の比は２０：１となる）添加した。更に、各種抗ＧＤ３キメラ抗体を各種濃度で加え、３７℃で４時間反応させた。反応後、プレートを遠心分離し、上清中の^{51}Ｃｒ量をγ－カウンターにて測定した。自然解離^{51}Ｃｒ量は、エフェクター細胞溶液、抗体溶液の代わりに培地のみを用いて上記と同様の操作を行い、上清中の^{51}Ｃｒ量を測定することに

より求めた。全解離^{51}Ｃｒ量は、抗体溶液の代わりに培地のみを、エフェクター細胞溶液の代わりに１ｍｏｌ／Ｌの塩酸溶液を添加し、上記と同様の操作を行い、上清中の^{51}Ｃｒ量を測定することにより求めた。ＡＤＣＣ活性は下式（１）により求めた。

$$\text{ADCC活性}(\%) = \frac{\text{検体上清中の}^{51}\text{Cr量} - \text{自然解離}^{51}\text{Cr量}}{\text{全解離}^{51}\text{Cr量} - \text{自然解離}^{51}\text{Cr量}} \times 100 \quad (1)$$

その結果を第３図に示した。第３図に示したように、５種類の抗ＧＤ３キメラ抗体のうち、ＹＢ２／０－ＧＤ３キメラ抗体が最も高いＡＤＣＣ活性を示し、次いでＳＰ２／０－ＧＤ３キメラ抗体、ＮＳＯ－ＧＤ３キメラ抗体、ＣＨＯ－ＧＤ３キメラ抗体の順に高いＡＤＣＣ活性を示した。培養に用いた培地の異なるＮＳＯ－ＧＤ３キメラ抗体（３０２）とＮＳＯ－ＧＤ３キメラ抗体（ＧＩＴ）では、それらのＡＤＣＣ活性に差は認められなかった。以上の結果は、抗体のＡＤＣＣ活性は、生産に用いる動物細胞によって大きく異なることを示している。その機構としては、抗原結合活性が同等であったことから、抗体のＦｃ領域の構造の差に起因していることが推測された。

実施例３．還元末端のＮ－アセチルグルコサミンの６位にフコースの１位がα結合していない糖鎖の割合の異なる抗ＧＤ３キメラ抗体の活性評価

１．還元末端のＮ－アセチルグルコサミンの６位にフコースの１位がα結合していない糖鎖の割合の異なる抗ＧＤ３キメラ抗体の調製

実施例１の２項（１）に記載した方法に従って、抗ＧＤ３キメラ抗体を生産するＹＢ２／０細胞由来の形質転換クローンを複数得た。それぞれのＹＢ２／０細胞由来の形質転換クローンより精製抗体を調製し、それぞれをロット１、ロット２、ロット３とした。抗ＧＤ３キメラ抗体ロット１、ロット２、ロット３の糖鎖分析を、以下の方法に従って行った。精製したそれぞれの抗体を、ウルトラフリー０．５－１０Ｋ（ミリポア社製）を用いて１０ｍｍｏｌ／Ｌ　KH_2PO_4に溶液を置換した。置換倍率は８０倍以上になるように行なった。

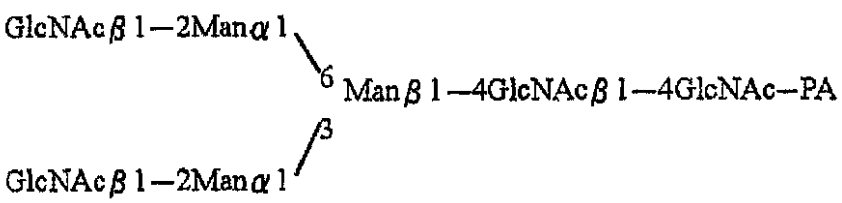
１００μｇの抗体をヒドラクラブＳ－２０４用試験管に入れ、遠心濃縮機にて乾固した。サンプルを乾固後、ホーネン社製ヒドラクラブにてヒドラジン分解を行なった。ヒドラジンはホーネン社製ヒドラジン分解試薬を用い、１１０℃、１時間反応させた［メソッド・オブ・エンザイモロジー（Ｍｅｔｈｏｄ　ｏｆ　Ｅｎｚｙｍｏｌｏｇｙ），８３，２６３（１９８２）］。反応後ヒドラジンを減圧留去させて、反応容器を３０分間放置して室温に戻した。ホーネン社製アセチル化試薬のａｃｅｔｙｌａｔｉｏｎ　ｒｅａｇｅｎｔを２５０μＬ、無水酢酸を２５μＬ入れてよく攪拌させ、室温で３０分間反応させた。さらにａｃｅｔｙｌａｔｉｏｎ　ｒｅａｇｅｎｔを２５０μＬ、無水酢酸を２５μＬ加えてよく攪拌させ、室温で１時間反応させた。試料を－８０℃のフリーザーで凍結させ、約１７時間凍結乾燥させた。凍結乾燥した試料から、ＴａＫａＲａ社製セルロースカートリッジグリカンプレパレーションキットを用いて糖鎖を回収した。試料糖鎖溶液を遠心濃縮機にて乾固後、２－アミノピリジンによる蛍光標識を行った［ジャーナル・オブ・バイオケミストリー（Ｊ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．），９５，１９７（１９８４）］。２－アミノピリジン溶液は２－アミノピリジン１ｇに対し塩酸溶液の７６０μＬを加え（１×ＰＡ溶液）、その溶液を逆浸透精製水で１０倍に希釈したものを用いた（１０倍希釈ＰＡ溶液）。シアノ水素化ホウ素ナトリウム溶液は、シアノ水素化ホウ素ナトリウム１０ｍｇに対し１×ＰＡ溶液２０μＬ、逆浸透精製水４３０μＬを加えて調製した。試料に１０倍希釈ＰＡ溶液を６７μＬ入れて１００℃、１５分間反応させ、放冷後にシアノ水素化ホウ素ナトリウム溶液を２μＬ入れて９０℃、１２時間反応させて試料糖鎖を蛍光標識した。蛍光標識した糖鎖群（ＰＡ化糖鎖群）を、Ｓｕｒｐｅｒｄｅｘ　Ｐｅｐｔｉｄｅ　ＨＲ　１０／３０カラム（Ｐｈａｒｍａｃｉａ社製）を用いて過剰な試薬と分離した。溶離液は１０ｍｍｏｌ／Ｌ炭酸水素アンモニウム、流速は０．５ｍＬ／分、カラム温度は室温、蛍光検出器は励起波長３２０ｎｍ、蛍光波長４００ｎｍで行なった。試料添加後２０分から３０分の溶出液を回収し、遠心濃縮機にて乾固させ、精製ＰＡ化糖鎖群とした。

次に、ＣＬＣ－ＯＤＳカラム（Ｓｈｉｍａｄｚｕ社製、φ６．０ｎｍ×１５０ｎｍ）を用

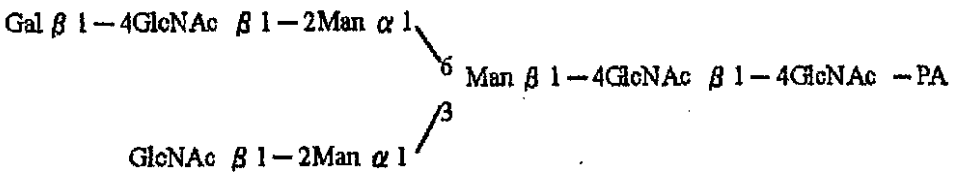
いて、精製ＰＡ化糖鎖群の逆相ＨＰＬＣ分析を行った。カラム温度は５５℃、流速は１ｍＬ／分、蛍光検出器は励起波長３２０ｎｍ、蛍光波長４００ｎｍで行なった。１０ｍｍｏｌ／Ｌリン酸ナトリウム緩衝液（ｐＨ３．８）でカラムを平衡化し、０．５％１－ブタノールの直線濃度勾配にて８０分間溶出した。第４図にロット２の抗ＧＤ３キメラ抗体の精製ＰＡ化糖鎖群の溶離図を示した。各ＰＡ化糖鎖の同定は、分取した各ＰＡ化糖鎖のピークのマトリックス支援レーザーイオン化飛行時間型質量分析（ＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ－ＭＳ分析）におけるポストソース分解（Ｐｏｓｔ　Ｓｏｕｒｃｅ　Ｄｅｃａｙ）分析、ＴａＫａＲａ社製ＰＡ化糖鎖スタンダードとの溶出位置の比較、並びに各種酵素を用いて各ＰＡ化糖鎖を消化後、逆相ＨＰＬＣ分析により行なった。

糖鎖含量は、逆相ＨＰＬＣ分析における各ＰＡ化糖鎖のピーク面積より算出した。還元末端がＮ－アセチルグルコサミンでないＰＡ化糖鎖は、不純物由来であるか、ＰＡ化糖鎖調製中の副反応物であるため、ピーク面積の算出から除外した。なお、図中の（ｉ）～（ｉｘ）のピークは、それぞれ以下の糖鎖構造（１）～（９）を示す。

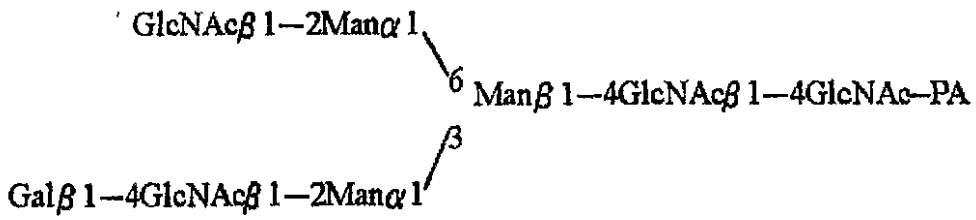
(1)



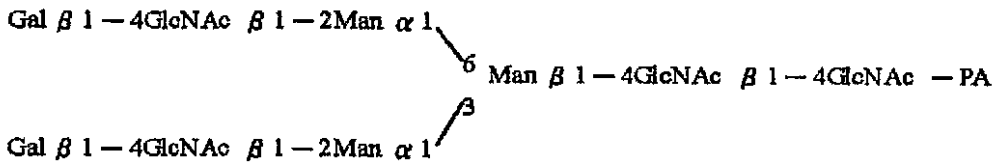
(2)



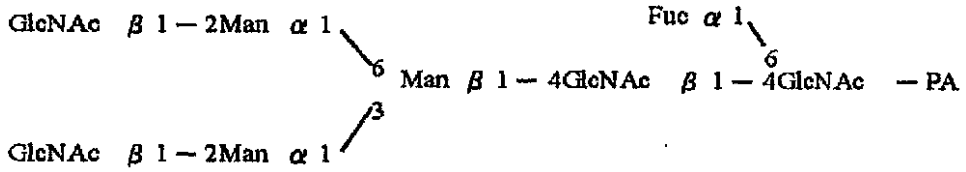
(3)



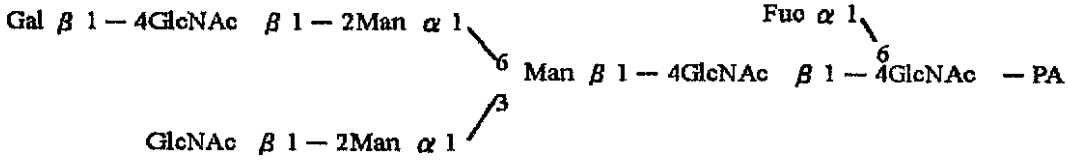
(4)



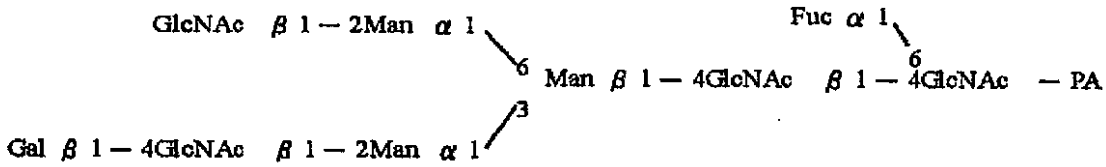
(5)



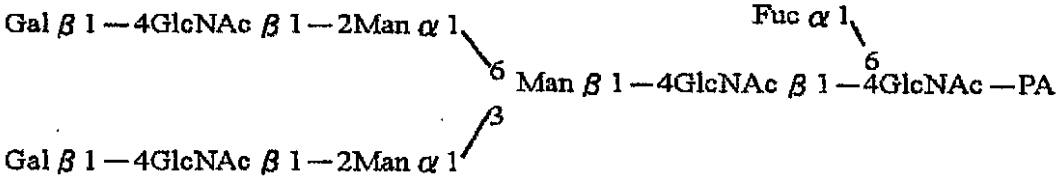
(6)



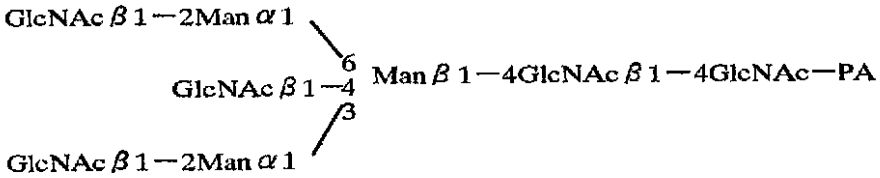
(7)



(8)



(9)



ＧｌｃＮＡｃはＮ－アセチルグルコサミン、Ｇａｌはガラクトース、Ｍａｎはマンノース、Ｆｕｃはフコース、ＰＡはピリジルアミノ基を示す。第４図において、還元末端のＮ－アセチルグルコサミンの６位にフコースの１位がα結合していない群の割合は、（ｉ）～（ｉｘ）のうち（ｉ）～（ｉｖ）のピークが占める面積、還元末端のＮ－アセチルグルコサミンの６位にフコースの１位がα結合した糖鎖群の割合は、（ｉ）～（ｉｘ）のうち（ｖ）～（ｉｘ）のピークが占める面積から算出した。それぞれの糖鎖群の割合は、２回の糖鎖分析の結果を平均した値を用いた。

その結果、還元末端のＮ－アセチルグルコサミンの６位にフコースの１位がα結合していない糖鎖の割合は、ロット１、ロット２、ロット３、それぞれ５０％、４５％、２９％であった。以下、これらの試料を、抗ＧＤ３キメラ抗体（５０％）、抗ＧＤ３キメラ抗体（４５％）、抗ＧＤ３キメラ抗体（２９％）と表記する。

また、実施例１の２項（２）で調製したＣＨＯ／ＤＧ４４細胞由来の抗ＧＤ３キメラ抗体

の糖鎖分析を上記記載の方法に従って行った結果、還元末端のＮ－アセチルグルコサミンの６位にフコースの１位がα結合していない糖鎖の割合は、７％であった。以下、本試料を抗ＧＤ３キメラ抗体（７％）と表記する。
さらに、抗ＧＤ３キメラ抗体（４５％）と抗ＧＤ３キメラ抗体（７％）を用い、抗ＧＤ３キメラ抗体（４５％）：抗ＧＤ３キメラ抗体（７％）＝５：３および１：７の割合で混合した。これらの試料を、上記記載の方法に従って糖鎖分析を行った結果、還元末端のＮ－アセチルグルコサミンの６位にフコースの１位がα結合していない糖鎖の割合は、２４％および１３％であった。これらの試料を以下、抗ＧＤ３キメラ抗体（２４％）、抗ＧＤ３キメラ抗体（１３％）と表記する。
２．抗体のＧＤ３に対する結合活性の評価（ＥＬＩＳＡ法）
実施例３の１項で調製した還元末端のＮ－アセチルグルコサミンの６位にフコースの１位がα結合していない糖鎖の割合の異なる６種類の抗ＧＤ３キメラ抗体のＧＤ３に対する結合活性は、実施例１の３項に示すＥＬＩＳＡ法により測定した。その結果、第５図に示したように、６種類の抗ＧＤ３キメラ抗体は、いずれも同等のＧＤ３に対する結合活性を示し、還元末端のＮ－アセチルグルコサミンの６位にフコースの１位がα結合していない糖鎖の割合は、抗体の抗原結合活性に影響を与えないことが明らかとなった。
３．ヒトメラノーマ細胞株に対するＡＤＣＣ活性の評価
実施例３の１項で調製した還元末端のＮ－アセチルグルコサミンの６位にフコースの１位がα結合していない糖鎖の割合の異なる６種類の抗ＧＤ３キメラ抗体のヒトメラノーマ細胞株Ｇ－３６１（ＡＴＣＣ　ＣＲＬ１４２４）に対するＡＤＣＣ活性は、実施例２の２項に記載の方法に従って測定した。
第６図および第７図には、２名の健常人ドナー（Ａ、Ｂ）のエフェクター細胞を用いてＡＤＣＣ活性を測定した結果をそれぞれ示した。第６図および第７図に示したように、抗ＧＤ３キメラ抗体のＡＤＣＣ活性は、いずれの抗体濃度においても還元末端のＮ－アセチルグルコサミンの６位にフコースの１位がα結合していない糖鎖の割合に比例して上昇する傾向を示した。抗体濃度が低ければ、ＡＤＣＣ活性は低下する。
抗体濃度が０．０５μｇ／ｍＬでは、還元末端のＮ－アセチルグルコサミンの６位にフコースの１位がα結合していない糖鎖が２４％、２９％、４５％および５０％のＡＤＣＣ活性はほぼ同様の高い活性を示したが、還元末端のＮ－アセチルグルコサミンの６位にフコースの１位がα結合していない糖鎖が２０％未満の抗体である、１３％および７％では、ＡＤＣＣ活性は低かった。本結果は、エフェクター細胞のドナーが異なっても同様であった。
実施例４．還元末端のＮ－アセチルグルコサミンの６位にフコースの１位がα結合していない糖鎖の割合の異なる抗ＣＣＲ４キメラ抗体の活性評価
１．抗ＣＣＲ４キメラ抗体の安定生産細胞の作製
ＷＯ０１／６４７５４に記載の抗ＣＣＲ４キメラ抗体のタンデム型発現ベクターｐＫＡＮＴＥＸ２１６０を用いて抗ＣＣＲ４キメラ抗体の安定生産細胞を以下のようにして作製した。
（１）ラットミエローマＹＢ２／０細胞を用いた生産細胞の作製
抗ＣＣＲ４キメラ抗体発現ベクターｐＫＡＮＴＥＸ２１６０の１０μｇを４×10^6細胞のラットミエローマＹＢ２／０細胞（ＡＴＣＣ　ＣＲＬ１６６２）へエレクトロポレーション法［サイトテクノロジー（Ｃｙｔｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ），３，１３３（１９９０）］により導入後、４０ｍＬのＨｙｂｒｉｄｏｍａ－ＳＦＭ－ＦＢＳ（５）［ＦＢＳ（ＰＡＡラボラトリーズ社製）を５％含むＨｙｂｒｉｄｏｍａ－ＳＦＭ培地（インビトロジェン社製）］に懸濁し、９６ウェル培養用プレート（住友ベークライト社製）に２００μＬ／ウェルずつ分注した。５％CO_2インキュベーター内で３７℃、２４時間培養した後、Ｇ４１８を１ｍｇ／ｍＬになるように添加して１～２週間培養した。Ｇ４１８耐性を示す形質転換株のコロニーが出現し、増殖の認められたウェルより培養上清を回収し、上清中の抗ＣＣＲ４キメラ抗体の抗原結合活性を実施例４の２項記載のＥＬＩＳＡ法により測定した。

培養上清中に抗ＣＣＲ４キメラ抗体の生産が認められたウェルの形質転換株については、ｄｈｆｒ遺伝子増幅系を利用して抗体生産量を増加させる目的で、Ｇ４１８を１ｍｇ／ｍＬ、ＤＨＦＲの阻害剤であるＭＴＸ（ＳＩＧＭＡ社製）を５０ｎｍｏｌ／Ｌ含むＨｙｂｒｉｄｏｍａ－ＳＦＭ－ＦＢＳ（５）培地に１～２×１０^{5}細胞／ｍＬになるように懸濁し、２４ウェルプレート（Ｇｒｅｉｎｅｒ社製）に１ｍＬずつ分注した。５％CO_2インキュベーター内で３７℃で１～２週間培養して、５０ｎｍｏｌ／Ｌ　ＭＴＸ耐性を示す形質転換株を誘導した。形質転換株の増殖が認められたウェルの培養上清中の抗ＣＣＲ４キメラ抗体の抗原結合活性を実施例４の２項記載のＥＬＩＳＡ法により測定した。

培養上清中に抗ＣＣＲ４キメラ抗体の生産が認められたウェルの形質転換株については、上記と同様の方法により、ＭＴＸ濃度を上昇させ、最終的にＭＴＸを２００ｎｍｏｌ／Ｌの濃度で含むＨｙｂｒｉｄｏｍａ－ＳＦＭ－ＦＢＳ（５）培地で増殖可能かつ、抗ＣＣＲ４キメラ抗体を高生産する形質転換株を得た。得られた形質転換株について、２回の限界希釈法によるクローン化を行い、得られた形質転換細胞クローンをＫＭ２７６０＃５８－３５－１６と名付けた。

（２）ＣＨＯ／ＤＧ４４細胞を用いた生産細胞の作製

抗ＣＣＲ４キメラ抗体発現ベクターｐＫＡＮＴＥＸ２１６０の４μｇを１．６×１０^{6}細胞のＣＨＯ／ＤＧ４４細胞へエレクトロポレーション法［サイトテクノロジー（Ｃｙｔｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ），３，１３３（１９９０）］により導入後、１０ｍＬのＩＭＤＭ－ｄＦＢＳ（１０）－ＨＴ（１）［ｄＦＢＳ（インビトロジェン社製）を１０％、ＨＴｓｕｐｐｌｅｍｅｎｔ（インビトロジェン社製）を１倍濃度で含むＩＭＤＭ培地（インビトロジェン社製）］に懸濁し、９６ウェル培養用プレート（岩城硝子社製）に１００μＬ／ウェルずつ分注した。５％CO_2インキュベーター内で３７℃、２４時間培養した後、ＩＭＤＭ－ｄＦＢＳ（１０）（ｄＦＢＳを１０％で含むＩＭＤＭ培地）に培地交換し、１～２週間培養した。ＨＴ非依存的な増殖を示す形質転換株のコロニーが出現し、増殖の認められたウェルより培養上清を回収し、上清中の抗ＣＣＲ４キメラ抗体の発現量を実施例４の２項記載のＥＬＩＳＡ法により測定した。

培養上清中に抗ＣＣＲ４キメラ抗体の生産が認められたウェルの形質転換株については、ｄｈｆｒ遺伝子増幅系を利用して抗体生産量を増加させる目的で、ＭＴＸを５０ｎｍｏｌ／Ｌ含むＩＭＤＭ－ｄＦＢＳ（１０）培地に１～２×１０^{5}細胞／ｍＬになるように懸濁し、２４ウェルプレート（岩城硝子社製）に０．５ｍＬずつ分注した。５％CO_2インキュベーター内で３７℃で１～２週間培養して、５０ｎｍｏｌ／Ｌ　ＭＴＸ耐性を示す形質転換株を誘導した。増殖が認められたウェルの形質転換株については、上記と同様の方法により、ＭＴＸ濃度を２００ｎｍｏｌ／Ｌに上昇させ、最終的にＭＴＸを２００ｎｍｏｌ／Ｌの濃度で含むＩＭＤＭ－ｄＦＢＳ（１０）培地で増殖可能かつ、抗ＣＣＲ４キメラ抗体を高生産する形質転換株を得た。得られた形質転換株は５－０３株と名付けた。

２．抗体のＣＣＲ４部分ペプチドに対する結合活性（ＥＬＩＳＡ法）

抗ＣＣＲ４キメラ抗体が反応し得るヒトＣＣＲ４細胞外領域ペプチドとして化合物１（配列番号２５）を選択した。ＥＬＩＳＡ法による活性測定に用いるため、以下の方法でＢＳＡ（ナカライテスク社製）とのコンジュゲートを作製し、抗原として用いた。すなわち、１０ｍｇのＢＳＡを含むＰＢＳ溶液９００ｍＬに、１００ｍＬの２５ｍｇ／ｍＬ　ＳＭＣＣ［４－（Ｎ－マレイミドメチル）シクロヘキサン－１－カルボキシリックアシッドＮ－ヒドロキシサクシンイミドエステル］（シグマ社製）－ＤＭＳＯ溶液を攪拌しながら滴下し、３０分間ゆっくりと攪拌した。２５ｍＬのＰＢＳで平衡化したＮＡＰ－１０カラムなどのゲルろ過カラムに反応液１ｍＬをアプライし、１．５ｍＬのＰＢＳで溶出させた溶出液をＢＳＡ－ＳＭＣＣ溶液とした（A_{280}測定からＢＳＡ濃度を算出）。次に、０．５ｍｇの化合物１に２５０ｍＬＰＢＳを加え、次いで２５０ｍＬ　ＤＭＦを加えて完全に溶解させた後、前述のＢＳＡ－ＳＭＣＣ溶液（ＢＳＡ換算１．２５ｍｇ）を攪拌下で添加して３時間ゆっくり攪拌した。反応液をＰＢＳに対して４℃、一晩透析し、最終濃度０．０５％となるようにアジ化ナトリウムを添加して、０．２２μｍフィルターでろ過した後ＢＳＡ－化合物１溶液とした。

９６ウェルのＥＬＩＳＡ用プレート（グライナー社製）に、上述のように調製したコンジュゲートを０．０５μｇ／ｍＬ、５０μＬ／ウェルで分注し、４℃で一晩放置して吸着させた。ＰＢＳで洗浄後、１％ＢＳＡ－ＰＢＳを１００μＬ／ウェルで加え、室温で１時間反応させて残存する活性基をブロックした。各ウェルをＴｗｅｅｎ－ＰＢＳで洗浄後、形質転換株の培養上清を５０μＬ／ウェルで加え、室温で１時間反応させた。反応後、各ウェルをＴｗｅｅｎ－ＰＢＳで洗浄後、１％ＢＳＡ－ＰＢＳで６０００倍に希釈したペルオキシダーゼ標識ヤギ抗ヒトＩｇＧ（γ）抗体溶液（Ａｍｅｒｉｃａｎ　Ｑｕａｌｅｘ社製）を二次抗体溶液として、５０μＬ／ウェルで加え、室温で１時間反応させた。反応後、Ｔｗｅｅｎ－ＰＢＳで洗浄後、ＡＢＴＳ基質液を５０μＬ／ウェルで加えて発色させ、２０分後に５％ＳＤＳ溶液を５０μＬ／ウェル加えて反応を停止した。その後ＯＤ４１５を測定した。実施例４の１項で得られた抗ＣＣＲ４キメラ抗体は、ＣＣＲ４に対する結合活性を示した。

３．抗ＣＣＲ４キメラ抗体の精製

（１）ＹＢ２／０細胞由来の生産細胞の培養および抗体の精製

実施例４の１項（１）で得られた抗ＣＣＲ４キメラ抗体を発現する形質転換細胞クローンＫＭ２７６０＃５８－３５－１６を２００ｎｍｏｌ／Ｌ　ＭＴＸ、Ｄａｉｇｏ’ｓ　ＧＦ２１（和光純薬製）を５％の濃度で含むＨｙｂｒｉｄｏｍａ－ＳＦＭ（インビトロジェン社製）培地に2×10^{5}細胞／ｍＬとなる様に懸濁し、スピナーボトル（岩城硝子社製）を用いて３７℃の恒温室内でＦｅｄ－Ｂａｔｃｈ攪拌培養した。８－１０日間培養して回収した培養上清より、Ｐｒｏｓｅｐ－Ａ（ミリポア社製）カラムおよびゲルろ過法を用いて、抗ＣＣＲ４キメラ抗体を精製した。精製した抗ＣＣＲ４キメラ抗体をＫＭ２７６０－１と名づけた。

（２）ＣＨＯ／ＤＧ４４細胞由来の生産細胞の培養および抗体の精製

実施例４の１項（２）で得られた抗ＣＣＲ４キメラ抗体を生産する形質転換細胞株５－０３株をＩＭＤＭ－ｄＦＢＳ（１０）培地中で、$182\ cm^{2}$フラスコ（Ｇｒｅｉｎｅｒ社製）にて５％CO_2インキュベーター内で３７℃にて培養した。数日後、細胞密度がコンフルエントに達した時点で培養上清を除去し、２５ｍＬのＰＢＳバッファーにて細胞を洗浄後、ＥＸＣＥＬＬ３０１培地（ＪＲＨ社製）を３５ｍＬ注入した。５％CO_2インキュベーター内で３７℃にて７日間培養後、培養上清を回収した。培養上清よりＰｒｏｓｅｐ－Ａ（ミリポア社製）カラムを用いて、添付の説明書に従い、抗ＣＣＲ４キメラ抗体を精製した。精製した抗ＣＣＲ４キメラ抗体はＫＭ３０６０と名付けた。

ＫＭ２７６０－１およびＫＭ３０６０のＣＣＲ４に対する結合活性を実施例４の２項に記載のＥＬＩＳＡ法により測定した結果、同等の結合活性を示した。

４．精製した抗ＣＣＲ４キメラ抗体の解析

実施例４の３項で得られた各種動物細胞で生産、精製した２種類の抗ＣＣＲ４キメラ抗体の各４μｇを公知の方法［ネイチャー（Ｎａｔｕｒｅ），２２７，６８０（１９７０）］に従ってＳＤＳ－ＰＡＧＥし、分子量および製精度を解析した。精製した各抗ＣＣＲ４キメラ抗体は、いずれも非還元条件下では分子量が約１５０Ｋｄの単一のバンドが、還元条件下では約５０Ｋｄと約２５Ｋｄの２本のバンドが認められた。これらの分子量は、抗体のＨ鎖およびＬ鎖のｃＤＮＡの塩基配列から推定される分子量（Ｈ鎖：約４９Ｋｄ、Ｌ鎖：約２３Ｋｄ、分子全体：約１４４Ｋｄ）とほぼ一致し、更に、ＩｇＧ型の抗体は、非還元条件下では分子量は約１５０Ｋｄであり、還元条件下では分子内のＳ－Ｓ結合が切断され、約５０Ｋｄの分子量を持つＨ鎖と約２５Ｋｄの分子量を持つＬ鎖に分解されるという報告（アンティボディズ，Ｃｈａｐｔｅｒ　１４、モノクローナル・アンティボディズ）と一致し、抗ＣＣＲ４キメラ抗体が正しい構造の抗体分子として発現され、かつ精製されたことが確認された。

５．還元末端のＮ－アセチルグルコサミンの６位にフコースの１位がα結合していない糖鎖の割合の異なる抗ＣＣＲ４キメラ抗体の調製

実施例４の３項で調製したＹＢ２／０細胞由来の抗ＣＣＲ４キメラ抗体ＫＭ２７６０－１とＣＨＯ／ＤＧ４４細胞由来の抗ＣＣＲ４キメラ抗体ＫＭ３０６０の糖鎖分析を、実施例

３の１項に記載の方法に従って行なった。還元末端のＮ－アセチルグルコサミンの６位にフコースの１位がα結合していない糖鎖の割合は、ＫＭ２７６０－１は８７％、ＫＭ３０６０は８％であった。以下、これらの試料を、抗ＣＣＲ４キメラ抗体（８７％）、抗ＣＣＲ４キメラ抗体（８％）と表記する。

さらに、抗ＣＣＲ４キメラ抗体（８７％）と抗ＣＣＲ４キメラ抗体（８％）を用い、抗ＣＣＲ４キメラ抗体（８７％）：抗ＣＣＲ４キメラ抗体（８％）＝１：３９、１６：６７、２２：５７、３２：４７、４２：３７の割合で混合した。これらの試料を実施例３の１項に記載の方法に従って糖鎖分析を行なった。還元末端のＮ－アセチルグルコサミンの６位にフコースの１位がα結合していない糖鎖の割合は、それぞれ９％、１８％、２７％、３９％、４６％であった。以下、これらの試料を抗ＣＣＲ４キメラ抗体（９％）、抗ＣＣＲ４キメラ抗体（１８％）、抗ＣＣＲ４キメラ抗体（２７％）、抗ＣＣＲ４キメラ抗体（３９％）、抗ＣＣＲ４キメラ抗体（４６％）と表記する。

第８図には、各試料の糖鎖分析の結果を示した。還元末端のＮ－アセチルグルコサミンの６位にフコースの１位がα結合していない糖鎖の割合は、２回の結果を平均した値を用いた。

６．抗体のＣＣＲ４部分ペプチドに対する結合活性の評価（ＥＬＩＳＡ法）

実施例４の５項で調製した還元末端のＮ－アセチルグルコサミンの６位にフコースの１位がα結合していない糖鎖の割合の異なる６種類の抗ＣＣＲ４キメラ抗体のＣＣＲ４部分ペプチドに対する結合活性は実施例４の２項に記載の方法に従って測定した。

その結果、第９図に示したように、６種類の抗ＣＣＲ４キメラ抗体は、いずれも同等のＣＣＲ４に対する結合活性を示し、還元末端のＮ－アセチルグルコサミンの６位にフコースの１位がα結合していない糖鎖の割合は、抗体の抗原結合活性に影響を与えないことが明らかとなった。

７．ヒトＣＣＲ４高発現細胞株に対するＡＤＣＣ活性の評価

抗ＣＣＲ４キメラ抗体のヒトＣＣＲ４高発現細胞に対するＡＤＣＣ活性は、以下のようにして測定した。

（１）標的細胞溶液の調製

ＷＯ０１／６４７５４に記載のヒトＣＣＲ４を高発現しているＣＣＲ４／ＥＬ－４細胞の１．５×１０^{6}細胞を調製し、放射性物質である$Na_2{}^{51}CrO_4$を５．５５ＭＢｑ当量加えて３７℃で１時間３０分間反応させ、細胞を放射性物質標識した。反応後、培地を用いた懸濁および遠心分離操作により３回洗浄し、培地に再懸濁し、４℃で３０分間氷中に放置して放射性物質を自然解離させた。遠心分離後、培地を７．５ｍＬ加え、２×１０^{5}細胞／ｍＬに調製し、標的細胞溶液とした。

（２）エフェクター細胞溶液の調製

健常人末梢血６０ｍＬを採取し、ヘパリンナトリウム（清水製薬社製）を０．６ｍＬを加え穏やかに混ぜた。これをＬｙｍｐｈｏｐｒｅｐ（ＡＸＩＳ　ＳＨＩＥＬＤ社製）を用いて使用説明書に従い、遠心分離（８００ｇ、２０分間）して単核球層を分離した。培地で３回遠心分離（１４００ｒｐｍ、５分間）して洗浄後、培地を用いて５×１０^{6}細胞／ｍＬの濃度で再懸濁し、エフェクター細胞溶液とした。

（３）ＡＤＣＣ活性の測定

９６ウェルＵ字底プレート（Ｆａｌｃｏｎ社製）の各ウェルに上記（１）で調製した標的細胞溶液の５０μＬ（１×１０^{4}細胞／ウェル）を分注した。次いで上記（２）で調製したエフェクター細胞溶液を１００μＬ（５×１０^{5}細胞／ウェル、ヒトエフェクター細胞と標的細胞の比は５０：１となる）添加した。さらに、抗ＣＣＲ４キメラ抗体を各最終濃度０．０００１～１０μｇ／ｍＬとなるように加え、３７℃で４時間反応させた。反応後、プレートを遠心分離し、上清中の^{51}Ｃｒ量をγ－カウンターにて測定した。自然解離^{51}Ｃｒ量は、ヒトエフェクター細胞溶液、抗体溶液の代わりに培地のみを用いて上記と同様の操作を行い、上清中の^{51}Ｃｒ量を測定することにより求めた。全解離^{51}Ｃｒ量は、抗体溶液とヒトエフェクター細胞溶液の代わりに１ｍｏｌ／Ｌの塩酸溶液を添加し、上記と同様の操作を行い、上清中の^{51}Ｃｒ量を測定することにより求めた。ＡＤＣＣ活

性（％）は前記式（１）により求めた。
第１０図および第１１図には、還元末端のＮ－アセチルグルコサミンの６位にフコースの１位がα結合していない糖鎖の割合の異なる抗ＣＣＲ４キメラ抗体の各種濃度（０．００１～１０μｇ／ｍＬ）におけるＡＤＣＣ活性を２名の健常人ドナー（Ａ，Ｂ）のエフェクター細胞を用いて測定した結果をそれぞれ示した。第１０図および第１１図に示したように、抗ＣＣＲ４キメラ抗体のＡＤＣＣ活性はいずれの抗体濃度においても還元末端のＮ－アセチルグルコサミンの６位にフコースの１位がα結合していない糖鎖の割合に比例して上昇する傾向を示した。抗体濃度が低ければ、ＡＤＣＣ活性は低下する。抗体濃度が０．０１μｇ／ｍＬでは、還元末端のＮ－アセチルグルコサミンの６位にフコースの１位がα結合していない糖鎖が２７％、３９％および４６％のＡＤＣＣ活性はほぼ同様の高い活性を示したが、還元末端のＮ－アセチルグルコサミンの６位にフコースの１位がα結合していない糖鎖が２０％未満の抗体では、ＡＤＣＣ活性は低かった。本結果は、エフェクター細胞のドナーが異なっても同様であった。
実施例５．宿主細胞株におけるα１，６－フコシルトランスフェラーゼ（ＦＵＴ８）遺伝子の転写産物の定量
１．各種細胞株由来一本鎖ｃＤＮＡの調製
ｄｈｆｒ遺伝子を欠損したＣＨＯ／ＤＧ４４細胞およびラットミエローマＹＢ２／０細胞より、以下の手順で一本鎖ｃＤＮＡを調製した。
ＣＨＯ／ＤＧ４４細胞を１０％ＦＢＳ（Ｌｉｆｅ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ社製）および１倍濃度のＨＴｓｕｐｐｌｅｍｅｎｔ（Ｌｉｆｅ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ社製）を添加したＩＭＤＭ培地（Ｌｉｆｅ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ社製）に懸濁し、2×10^5個／ｍＬの密度で接着細胞培養用Ｔ７５フラスコ（Ｇｒｅｉｎｅｒ社製）に１５ｍＬ播種した。また、ＹＢ２／０細胞を１０％ＦＢＳ（Ｌｉｆｅ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ社製）、４ｍｍｏｌ／Ｌ Ｌ－Ｇｌｎ（Ｌｉｆｅ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ社製）を添加したＲＰＭＩ１６４０培地（Ｌｉｆｅ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ社製）に懸濁し、2×10^5個／ｍＬの密度で浮遊細胞培養用Ｔ７５フラスコ（Ｇｒｅｉｎｅｒ社製）に１５ｍＬ播種した。これらを３７℃の５％CO_2インキュベーター内で培養し、培養１日目、２日目、３日目、４日目および５日目に各宿主細胞1×10^7個を回収後、ＲＮＡｅａｓｙ（ＱＩＡＧＥＮ社製）により添付の説明書に従って全ＲＮＡを抽出した。
全ＲＮＡを４５μＬの滅菌水に溶解し、ＲＱ１ ＲＮａｓｅ－Ｆｒｅｅ ＤＮａｓｅ（Ｐｒｏｍｅｇａ社製）１μＬ、付属の１０×ＤＮａｓｅ ｂｕｆｆｅｒ ５μＬ、ＲＮａｓｉｎ Ｒｉｂｏｎｕｃｌｅａｓｅ ｉｎｈｉｂｉｔｏｒ（Ｐｒｏｍｅｇａ社製）０．５μＬをそれぞれに添加して、３７℃で３０分間反応させることにより、試料中に混入したゲノムＤＮＡを分解した。反応後、ＲＮＡｅａｓｙ（ＱＩＡＧＥＮ社製）により全ＲＮＡを再精製し、５０μＬの滅菌水に溶解した。
得られた各々の全ＲＮＡ３μｇに対し、ＳＵＰＥＲＳＣＲＩＰＴ^{TM} Ｐｒｅａｍｐｌｉｆｉｃａｔｉｏｎ Ｓｙｓｔｅｍｆｏｒ Ｆｉｒｓｔ Ｓｔｒａｎｄ ｃＤＮＡ Ｓｙｎｔｈｅｓｉｓ（Ｌｉｆｅ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ社製）を用いて添付の説明書に従い、オリゴ（ｄＴ）をプライマーとした２０μＬの系で逆転写反応を行うことにより、一本鎖ｃＤＮＡを合成した。各宿主細胞由来ＦＵＴ８、β－アクチンのクローニングには該反応液の１倍濃度液を、競合的ＰＣＲによる各遺伝子転写量の定量には該反応液の５０倍希釈水溶液を用い、各々使用するまで－８０℃で保管した。
２．チャイニーズハムスターＦＵＴ８およびラットＦＵＴ８の各ｃＤＮＡ部分断片の取得
チャイニーズハムスターＦＵＴ８およびラットＦＵＴ８の各ｃＤＮＡ部分断片の取得は、以下の手順で行った（第１２図）。
まず、ヒトＦＵＴ８のｃＤＮＡ［ジャーナル・オブ・バイオケミストリー（Ｊ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．），１２１，６２６，（１９９７）］およびブタＦＵＴ８のｃＤＮＡ［ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー（Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．），２７１，２７８１０，（１９９６）］に共通の塩基配列に対して特異的なプライマー（配列番号４および配列番号５に示す）を設計した。

次にＤＮＡポリメラーゼＥｘＴａｑ（宝酒造社製）を用いて、実施例５の１項で調製した培養２日目のＣＨＯ／ＤＧ４４細胞由来ｃＤＮＡおよびＹＢ２／０細胞由来ｃＤＮＡを各々１μＬを含む２５μＬの反応液［１倍濃度のＥｘＴａｑ　ｂｕｆｆｅｒ（宝酒造社製）、０．２ｍｍｏｌ／ＬｄＮＴＰｓ、０．５μｍｏｌ／Ｌ上記遺伝子特異的プライマー（配列番号４および配列番号５）］を調製し、ポリメラーゼ連鎖反応（以下、ＰＣＲと表記する）を行った。ＰＣＲは、９４℃で１分間の加熱の後、９４℃で３０秒間、５５℃で３０秒間、７２℃で２分間からなる反応を１サイクルとして３０サイクルの後、さらに７２℃で１０分間加熱する条件で行った。

ＰＣＲ後、反応液を０．８％アガロースゲル電気泳動に供し、特異的増幅断片９７９ｂｐをＧＥＮＥＣＬＥＡＮ　Ｓｐｉｎ　Ｋｉｔ（ＢＩＯ１０１社製）を用いて精製し、滅菌水１０μＬで溶出した（以下、アガロースゲルからのＤＮＡ断片の精製にはこの方法を用いた）。上記増幅断片４μＬを、ＴＯＰＯ　ＴＡ　ｃｌｏｎｉｎｇ　Ｋｉｔ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ社製）の説明書に従って、プラスミドｐＣＲ２．１へ挿入し、該反応液を用いて大腸菌ＸＬ１－Ｂｌｕｅ株をコーエンらの方法［プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス（Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．Ｕ．Ｓ．Ａ．），６９，２１１０（１９７２）］（以下、大腸菌の形質転換にはこの方法を用いた）により形質転換した。得られたカナマイシン耐性コロニーのうちｃＤＮＡが組み込まれた６クローンから、公知の方法［ヌクレイック・アシッド・リサーチ（Ｎｕｃｌｅｉｃ　Ａｃｉｄｓ　Ｒｅｓｅａｒｃｈ），７，１５１３（１９７９）］（以下、プラスミドの単離方法にはこの方法を用いた）に従って各々プラスミドＤＮＡを単離した。

各プラスミドに挿入されたｃＤＮＡの塩基配列は、ＤＮＡシークエンサー３７７（Ｐａｒｋｉｎ　Ｅｌｍｅｒ社製）およびＢｉｇＤｙｅ　Ｔｅｒｍｉｎａｔｏｒ　Ｃｙｃｌｅ　Ｓｅｑｕｅｎｃｉｎｇ　ＦＳ　Ｒｅａｄｙ　Ｒｅａｃｔｉｏｎ　Ｋｉｔ（Ｐａｒｋｉｎ　Ｅｌｍｅｒ社製）を添付マニュアルに従い使用して決定した。本法により配列決定した全ての挿入ｃＤＮＡがチャイニーズハムスターＦＵＴ８およびラットＦＵＴ８（配列番号６および７に示す）のオープンリーディングフレーム（以下、ＯＲＦと表記する）部分配列をコードすることを確認した。このうちＰＣＲに伴う塩基の読み誤りを該配列内に全く含まないプラスミドＤＮＡを選択した。以下、各プラスミドをＣＨＦＴ８－ｐＣＲ２．１およびＹＢＦＴ８－ｐＣＲ２．１と称す。

３．チャイニーズハムスターβ－アクチンおよびラットβ－アクチンｃＤＮＡの取得

チャイニーズハムスターβ－アクチンおよびラットβ－アクチンの取得は、以下の手順で行った（第１３図）。

まず、チャイニーズハムスターβ－アクチンゲノム配列（ＧｅｎＢａｎｋ，Ｕ２０１１４）およびラットβ－アクチンゲノム配列［ヌクレイック・アシッド・リサーチ（Ｎｕｃｌｅｉｃ　Ａｃｉｄｓ　Ｒｅｓｅａｒｃｈ），１１，１７５９（１９８３）］より、翻訳開始コドンを含む共通配列に特異的なフォワードプライマー（配列番号８に示す）および翻訳終止コドンを含む各配列特異的なリバースプライマー（配列番号９および配列番号１０に示す）を設計した。

次にＤＮＡポリメラーゼＫＯＤ（東洋紡績社製）を用いて、実施例５の１項で調製した培養２日目のＣＨＯ／ＤＧ４４細胞由来ｃＤＮＡおよびＹＢ２／０細胞由来ｃＤＮＡ　１μＬを含む２５μＬの反応液［１倍濃度のＫＯＤ　ｂｕｆｆｅｒ＃１（東洋紡績社製）、０．２ｍｍｏｌ／Ｌ　ｄＮＴＰｓ、１ｍｍｏｌ／Ｌ　$MgCl_2$、０．４μｍｏｌ／Ｌ上記遺伝子特異的プライマー（配列番号８および９、または配列番号８および１０）、５％ＤＭＳＯ］を調製し、ＰＣＲを行った。ＰＣＲは、９４℃で４分間の加熱の後、９８℃で１５秒間、６５℃で２秒間、７４℃で３０秒間からなる反応を１サイクルとして、２５サイクル行った。

ＰＣＲ後、反応液を０．８％アガロースゲル電気泳動に供し、特異的増幅断片１１２８ｂｐを精製した。このＤＮＡ断片に対し、ＭＥＧＡＬＡＢＥＬ（宝酒造社製）を用いて、添付の説明書に従い５’末端のリン酸化を行った。該反応液よりエタノール沈殿法を用いてＤＮＡ断片を回収し、滅菌水１０μＬに溶解した。

一方、プラスミドｐＢｌｕｅｓｃｒｉｐｔＩＩ　ＫＳ（＋）３μｇ（Ｓｔｒａｔａｇｅｎｅ社製）をＮＥＢｕｆｆｅｒ２（Ｎｅｗ　Ｅｎｇｌａｎｄ　Ｂｉｏｌａｂｓ社製）３５μＬに溶解し、１６単位の制限酵素ＥｃｏＲＶ（宝酒造社製）を加えて３７℃で３時間消化反応を行った。該反応液にｐＨ８．０の１ｍｏｌ／Ｌ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ緩衝液３５μＬおよび大腸菌Ｃ１５株由来Ａｌｋａｌｉｎｅ　Ｐｈｏｓｐｈａｔａｓｅ（宝酒造社製）３．５μＬを添加して６５℃で３０分間反応させることにより、ＤＮＡ末端の脱リン酸化を行った。この反応液に対しフェノール／クロロホルム抽出処理の後、エタノール沈殿法を行い回収したＤＮＡ断片を滅菌水１００μＬに溶解した。

上記で得たチャイニーズハムスターｃＤＮＡ由来増幅断片およびラットｃＤＮＡ由来増幅断片（１１９２ｂｐ）４μＬ、プラスミドｐＢｌｕｅｓｃｒｉｐｔＩＩ　ＫＳ（＋）由来のＥｃｏＲＶ－ＥｃｏＲＶ断片（約３．０Ｋｂ）１μＬ、Ｌｉｇａｔｉｏｎ　Ｈｉｇｈ（東洋紡績社製）５μＬを混合し、１６℃で３０分間反応させることにより連結反応を行った。該反応液を用いて大腸菌ＸＬ１－Ｂｌｕｅ株を形質転換し、得られたアンピシリン耐性コロニーより公知の方法に従って各々プラスミドＤＮＡを単離した。

各プラスミドに挿入されたｃＤＮＡの塩基配列は、ＤＮＡシークエンサー３７７（Ｐａｒｋｉｎ　Ｅｌｍｅｒ社製）およびＢｉｇＤｙｅ　Ｔｅｒｍｉｎａｔｏｒ　Ｃｙｃｌｅ　Ｓｅｑｕｅｎｃｉｎｇ　ＦＳ　Ｒｅａｄｙ　Ｒｅａｃｔｉｏｎ　Ｋｉｔ（Ｐａｒｋｉｎ　Ｅｌｍｅｒ社製）を添付マニュアルに従い使用して決定した。本法により配列決定した全ての挿入ｃＤＮＡが、チャイニーズハムスターβ－アクチンおよびラットβ－アクチン各ｃＤＮＡのＯＲＦ全長配列をコードすることを確認した。このうちＰＣＲに伴う塩基の読み誤りを該配列内に全く含まないプラスミドＤＮＡを選択した。以下、各プラスミドをＣＨＡｃ－ｐＢＳおよびＹＢＡｃ－ｐＢＳと称す。

４．ＦＵＴ８スタンダードおよび内部コントロールの調製

各細胞内のＦＵＴ８遺伝子由来ｍＲＮＡ転写量を測定するために、検量線に用いるスタンダードとして、実施例５の２項で得たチャイニーズハムスターＦＵＴ８およびラットＦＵＴ８の各ｃＤＮＡ部分断片をｐＣＲ２．１に組み込んだプラスミドであるＣＨＦＴ８－ｐＣＲ２．１およびＹＢＦＴ８－ｐＣＲ２．１を制限酵素ＥｃｏＲＩで切断し直鎖化したＤＮＡを用いた。ＦＵＴ８定量の内部コントロールとしては、ＣＨＦＴ８－ｐＣＲ２．１およびＹＢＦＴ８－ｐＣＲ２．１のうち、チャイニーズハムスターＦＵＴ８およびラットＦＵＴ８の内部塩基配列のＳｃａＩ－ＨｉｎｄＩＩＩ間２０３ｂｐを欠失させることにより得られたＣＨＦＴ８ｄ－ｐＣＲ２．１およびＹＢＦＴ８ｄ－ｐＣＲ２．１を、制限酵素ＥｃｏＲＩで切断し直鎖化したＤＮＡを用いた。以下にその詳細を説明する。

チャイニーズハムスターＦＵＴ８およびラットＦＵＴ８のスタンダードの調製は次の手順で行った。プラスミドＣＨＦＴ８－ｐＣＲ２．１の２μｇをＮＥＢｕｆｆｅｒ　２（Ｎｅｗ　Ｅｎｇｌａｎｄ　Ｂｉｏｌａｂｓ社製）４０μＬに溶解し、２４単位の制限酵素ＥｃｏＲＩ（宝酒造社製）を加えて３７℃で３時間消化反応を行った。一方、プラスミドＹＢＦＴ８－ｐＣＲ２．１の２μｇをＮＥＢｕｆｆｅｒ　２（Ｎｅｗ　Ｅｎｇｌａｎｄ　Ｂｉｏｌａｂｓ社製）４０μＬに溶解し、２４単位の制限酵素ＥｃｏＲＩ（宝酒造社製）を加えて３７℃で３時間消化反応を行った。該反応液の一部を０．８％アガロースゲル電気泳動に供し、上記制限酵素消化反応によりチャイニーズハムスターＦＵＴ８およびラットＦＵＴ８各ｃＤＮＡ部分断片を含むＥｃｏＲＩ－ＥｃｏＲＩ断片（約１Ｋｂ）がプラスミドＣＨＦＴ８－ｐＣＲ２．１およびＹＢＦＴ８－ｐＣＲ２．１より分離されたことを確認した。各反応液より、１μｇ／ｍＬパン酵母由来ｔ－ＲＮＡ（ＳＩＧＭＡ社製）を用いて０．０２ｆｇ／μＬ、０．２ｆｇ／μＬ、１ｆｇ／μＬ、２ｆｇ／μＬ、１０ｆｇ／μＬ、２０ｆｇ／μＬ、１００ｆｇ／μＬの希釈液を調製し、これらをチャイニーズハムスターＦＵＴ８およびラットＦＵＴ８のスタンダードとした。

チャイニーズハムスターＦＵＴ８およびラットＦＵＴ８の内部コントロールの調製は次のように行った（第１４図）。ＤＮＡポリメラーゼＫＯＤ（東洋紡績社製）を用いて、ＣＨＦＴ８－ｐＣＲ２．１およびＹＢＦＴ８－ｐＣＲ２．１の５ｎｇを含む２５μＬの反応液［１倍濃度のＫＯＤ　ｂｕｆｆｅｒ＃１（東洋紡績社製）、０．２ｍｍｏｌ／Ｌ　ｄＮＴ

Ｐｓ、１ｍｍｏｌ／Ｌ $MgCl_2$、０．４μｍｏｌ／Ｌ遺伝子特異的プライマー（配列番号１１および１２）、５％ＤＭＳＯ］を調製し、ＰＣＲを行った。ＰＣＲは、９４℃で４分間の加熱の後、９８℃で１５秒間、６５℃で２秒間、７４℃で３０秒間からなる反応を１サイクルとして、２５サイクル行った。ＰＣＲ後、反応液を０．８％アガロースゲル電気泳動に供し、特異的増幅断片約４．７Ｋｂを精製した。該ＤＮＡ断片に対し、ＭＥＧＡＬＡＢＥＬ（宝酒造社製）を用いて、添付の説明書に従い５’末端のリン酸化を行った後、反応液よりエタノール沈殿法を用いてＤＮＡ断片を回収し、滅菌水５０μＬに溶解した。上記で得たＤＮＡ断片（約４．７Ｋｂ）５μＬおよびＬｉｇａｔｉｏｎ Ｈｉｇｈ（東洋紡績社製）５μＬを混合し、１６℃で３０分間反応させることにより自己環状化反応を行った。

該反応液を用いて大腸菌ＤＨ５α株を形質転換し、得られたアンピシリン耐性コロニーより公知の方法に従って各々プラスミドＤＮＡを単離した。各プラスミドＤＮＡに対しＤＮＡシークエンサー３７７（Ｐａｒｋｉｎ Ｅｌｍｅｒ社製）およびＢｉｇＤｙｅＴｅｒｍｉｎａｔｏｒ Ｃｙｃｌｅ Ｓｅｑｕｅｎｃｉｎｇ ＦＳ Ｒｅａｄｙ Ｒｅａｃｔｉｏｎ Ｋｉｔ（Ｐａｒｋｉｎ Ｅｌｍｅｒ社製）を用いて配列決定を行い、同プラスミドに挿入されたチャイニーズハムスターＦＵＴ８およびラットＦＵＴ８の内部塩基配列ＳｃａＩ－ＨｉｎｄＩＩＩ間２０３ｂｐが欠失したことを確認した。得られた各プラスミドをＣＨＦＴ８ｄ－ｐＣＲ２．１およびＹＢＦＴ８ｄ－ｐＣＲ２．１と称す。

次にプラスミドＣＨＦＴ８ｄ－ｐＣＲ２．１の２μｇをＮＥＢｕｆｆｅｒ ２（Ｎｅｗ Ｅｎｇｌａｎｄ Ｂｉｏｌａｂｓ社製）４０μＬに溶解し、２４単位の制限酵素ＥｃｏＲＩ（宝酒造社製）を加えて３７℃で３時間消化反応を行った。一方、プラスミドＹＢＦＴ８ｄ－ｐＣＲ２．１の２μｇをＮＥＢｕｆｆｅｒ ２（Ｎｅｗ Ｅｎｇｌａｎｄ Ｂｉｏｌａｂｓ社製）４０μＬに溶解し、２４単位の制限酵素ＥｃｏＲＩ（宝酒造社製）を加えて３７℃で３時間消化反応を行った。該反応液の一部を０．８％アガロースゲル電気泳動に供し、上記制限酵素消化反応によりチャイニーズハムスターＦＵＴ８およびラットＦＵＴ８部分断片の内部塩基配列２０３ｂｐが欠失した断片を含むＥｃｏＲＩ－ＥｃｏＲＩ断片（約８００ｂｐ）がプラスミドＣＨＦＴ８ｄ－ｐＣＲ２．１およびＹＢＦＴ８ｄ－ｐＣＲ２．１より分離されたことを確認した。各反応液より、１μｇ／ｍＬパン酵母由来ｔ－ＲＮＡ（ＳＩＧＭＡ社製）を用いて２ｆｇ／μＬの希釈液を調製し、これらをチャイニーズハムスターＦＵＴ８およびラットＦＵＴ８の内部コントロールとした。

５．β－アクチンスタンダードおよび内部コントロールの調製

各宿主細胞内のβ－アクチン遺伝子由来ｍＲＮＡ転写量を測定するために、検量線に用いるスタンダードとして、実施例５の３項で得たチャイニーズハムスターβ－アクチンおよびラットβ－アクチン各ｃＤＮＡのＯＲＦ全長をｐＢｌｕｅｓｃｒｉｐｔＩＩ ＫＳ（＋）に組み込んだプラスミドであるＣＨＡｃ－ｐＢＳおよびＹＢＡｃ－ｐＢＳを、前者は制限酵素ＨｉｎｄＩＩＩおよびＰｓｔＩで、後者は制限酵素ＨｉｎｄＩＩＩおよびＫｐｎＩで、各々切断し直鎖化したＤＮＡを用いた。β－アクチン定量の内部コントロールとしては、ＣＨＡｃ－ｐＢＳおよびＹＢＡｃ－ｐＢＳのうち、チャイニーズハムスターβ－アクチンおよびラットβ－アクチンの内部塩基配列のＤｒａＩＩＩ－ＤｒａＩＩＩ間１８０ｂｐを欠失させることにより得られたＣＨＡｃｄ－ｐＢＳおよびＹＢＡｃｄ－ｐＢＳを、前者は制限酵素ＨｉｎｄＩＩＩおよびＰｓｔＩで、後者は制限酵素ＨｉｎｄＩＩＩおよびＫｐｎＩで、切断し直鎖化したＤＮＡを用いた。以下にその詳細を説明する。

チャイニーズハムスターβ－アクチンおよびラットβ－アクチンのスタンダードの調製は次の手順で行った。プラスミドＣＨＡｃ－ｐＢＳの２μｇをＮＥＢｕｆｆｅｒ ２（Ｎｅｗ Ｅｎｇｌａｎｄ Ｂｉｏｌａｂｓ社製）４０μＬに溶解し、２５単位の制限酵素ＨｉｎｄＩＩＩ（宝酒造社製）および２０単位のＰｓｔＩ（宝酒造社製）を加えて３７℃で３時間消化反応を行った。一方、プラスミドＹＢＡｃ－ｐＢＳの２μｇをＮＥＢｕｆｆｅｒ ２（Ｎｅｗ Ｅｎｇｌａｎｄ Ｂｉｏｌａｂｓ社製）４０μＬに溶解し、２５単位の制限酵素ＨｉｎｄＩＩＩ（宝酒造社製）および２４単位のＫｐｎＩ（宝酒造社製）を加えて３７℃で３時間消化反応を行った。該反応液の一部を０．８％アガロースゲル電気泳動に

供し、上記制限酵素消化反応によりチャイニーズハムスターβ－アクチンおよびラットβ－アクチン各ｃＤＮＡ　ＯＲＦ全長を含むＨｉｎｄＩＩＩ－ＰｓｔＩ断片およびＨｉｎｄＩＩＩ－ＫｐｎＩ断片（約１．２Ｋｂ）がプラスミドＣＨＡｃ－ｐＢＳおよびＹＢＡｃ－ｐＢＳより分離されたことを確認した。各反応液より、１μｇ／ｍＬパン酵母由来ｔ－ＲＮＡ（ＳＩＧＭＡ社製）を用いて２ｐｇ／μＬ、１ｐｇ／μＬ、２００ｆｇ／μＬ、１００ｆｇ／μＬ、２０ｆｇ／μＬの希釈液を調製し、これらをチャイニーズハムスターβ－アクチンおよびラットβ－アクチンのスタンダードとした。

チャイニーズハムスターβ－アクチンおよびラットβ－アクチンの内部コントロールの調製は次の手順で行った（第１５図）。ＣＨＡｃ－ｐＢＳの２μｇを１００ｎｇ／μＬＢＳＡ（Ｎｅｗ　Ｅｎｇｌａｎｄ　Ｂｉｏｌａｂｓ社製）を含むＮＥＢｕｆｆｅｒ　３（Ｎｅｗ　Ｅｎｇｌａｎｄ　Ｂｉｏｌａｂｓ社製）１００μＬに溶解し、１０単位の制限酵素ＤｒａＩＩＩ（Ｎｅｗ　Ｅｎｇｌａｎｄ　Ｂｉｏｌａｂｓ）を加えて３７℃で３時間消化反応を行った。該反応液よりエタノール沈殿法を用いてＤＮＡ断片を回収し、ＤＮＡ　Ｂｌｕｎｔｉｎｇ　Ｋｉｔ（宝酒造社製）を用い、添付の説明書に従ってＤＮＡ末端の平滑化を行った後、反応液を２等分した。まず一方の反応液には、ｐＨ８．０の１ｍｏｌ／Ｌ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ緩衝液３５μＬおよび大腸菌Ｃ１５株由来Ａｌｋａｌｉｎｅ　Ｐｈｏｓｐｈａｔａｓｅ（宝酒造社製）３．５μＬを添加し、６５℃で３０分間反応させることによりＤＮＡ末端の脱リン酸化を行った。脱リン酸化処理、フェノール／クロロホルム抽出処理およびエタノール沈殿法を行い、回収したＤＮＡ断片を滅菌水１０μＬに溶解した。残る他方の反応液は０．８％アガロースゲル電気泳動に供し、チャイニーズハムスターβ－アクチンＯＲＦ部分断片を含む約１．１ＫｂのＤＮＡ断片を精製した。

上記で得た脱リン酸化ＤｒａＩＩＩ－ＤｒａＩＩＩ断片０．５μＬ、約１．１ＫｂのＤｒａＩＩＩ－ＤｒａＩＩＩ断片４．５μＬ、Ｌｉｇａｔｉｏｎ　Ｈｉｇｈ（東洋紡績社製）５μＬを混合し、１６℃で３０分間反応させることにより連結反応を行った。該反応液を用いて大腸菌ＤＨ５α株を形質転換し、得られたアンピシリン耐性コロニーより公知の方法に従って各々プラスミドＤＮＡを単離した。各プラスミドＤＮＡに対しＤＮＡシークエンサー３７７（Ｐａｒｋｉｎ　Ｅｌｍｅｒ社製）およびＢｉｇＤｙｅ　Ｔｅｒｍｉｎａｔｏｒ　Ｃｙｃｌｅ　Ｓｅｑｕｅｎｃｉｎｇ　ＦＳ　Ｒｅａｄｙ　Ｒｅａｃｔｉｏｎ　Ｋｉｔ（Ｐａｒｋｉｎ　Ｅｌｍｅｒ社製）を用いて配列決定を行い、同プラスミドに挿入されたチャイニーズハムスターβ－アクチンＤｒａＩＩＩ－ＤｒａＩＩＩ間１８０ｂｐが欠失したことを確認した。本プラスミドをＣＨＡｃｄ－ｐＢＳと称す。

また、ラットβ－アクチンＤｒａＩＩＩ－ＤｒａＩＩＩ間１８０ｂｐが欠失したプラスミドをＣＨＡｃｄ－ｐＢＳと同様の工程を経て作製した。本プラスミドをＹＢＡｃｄ－ｐＢＳと称す。

次にプラスミドＣＨＡｃｄ－ｐＢＳの２μｇをＮＥＢｕｆｆｅｒ　２（Ｎｅｗ　Ｅｎｇｌａｎｄ　Ｂｉｏｌａｂｓ社製）４０μＬに溶解し、２５単位の制限酵素ＨｉｎｄＩＩＩ（宝酒造社製）および２０単位のＰｓｔＩ（宝酒造社製）を加えて３７℃で３時間消化反応を行った。一方、プラスミドＹＢＡｃｄ－ｐＢＳ　２μｇをＮＥＢｕｆｆｅｒ　２（Ｎｅｗ　Ｅｎｇｌａｎｄ　Ｂｉｏｌａｂｓ社製）４０μＬに溶解し、２５単位の制限酵素ＨｉｎｄＩＩＩ（宝酒造社製）および２４単位のＫｐｎＩ（宝酒造社製）を加えて３７℃で３時間消化反応を行った。該反応液の一部を０．８％アガロースゲル電気泳動に供し、上記制限酵素消化反応によりチャイニーズハムスターβ－アクチンおよびラットβ－アクチン各ｃＤＮＡ　ＯＲＦ全長の内部塩基配列１８０ｂｐが欠失した断片を含むＨｉｎｄＩＩＩ－ＰｓｔＩ断片およびＨｉｎｄＩＩＩ－ＫｐｎＩ断片（約１．０Ｋｂ）がプラスミドＣＨＡｃｄ－ｐＢＳおよびＹＢＡｃｄ－ｐＢＳより分離されたことを確認した。各反応液より、１μｇ／Ｌパン酵母由来ｔ－ＲＮＡ（ＳＩＧＭＡ社製）を用いて２００ｆｇ／μＬの希釈液を調製し、これらをチャイニーズハムスターβ－アクチンおよびラットβ－アクチンの内部コントロールとした。

６．競合的ＰＣＲによる転写量の定量

実施例５の４項で作製したＦＵＴ８内部コントロールＤＮＡおよび実施例５の１項で得た

宿主細胞株由来ｃＤＮＡを鋳型として競合的ＰＣＲを行い、各鋳型に由来する増幅産物量の相対値より、宿主細胞株内のＦＵＴ８の転写産物の定量値を算出した。一方、β－アクチン遺伝子は各細胞において恒常的に転写されており、その転写量は細胞間で同程度と考えられているため、各宿主細胞株由来ｃＤＮＡ合成反応の効率の目安として、β－アクチン遺伝子の転写量を定量した。すなわち、実施例５の５項で作製したβ－アクチン内部コントロールＤＮＡおよび実施例５の１項で得た宿主細胞株由来ｃＤＮＡを鋳型としてＰＣＲを行い、各鋳型に由来する増幅産物量の相対値より、宿主細胞株内のβ－アクチンの転写産物の定量値を算出した。以下にその詳細を説明する。

ＦＵＴ８の転写産物の定量は次の手順で行った。まず、実施例５の２項で得たチャイニーズハムスターＦＵＴ８およびラットＦＵＴ８　ＯＲＦ部分配列の内部配列に対し、共通配列特異的なプライマーセット（配列番号１３および１４に示す）を設計した。

次に、実施例５の１項で得た各宿主細胞株由来のｃＤＮＡ溶液の５０倍希釈液５μＬおよび内部コントロール用プラスミド５μＬ（１０ｆｇ）を含む総体積２０μＬの反応液［１倍濃度のＥｘＴａｑ　ｂｕｆｆｅｒ（宝酒造社製）、０．２ｍｍｏｌ／Ｌ　ｄＮＴＰｓ、０．５μｍｏｌ／Ｌ上記遺伝子特異的プライマー（配列番号１３および１４）、５％ＤＭＳＯ］で、ＤＮＡポリメラーゼＥｘＴａｑ（宝酒造社製）を用いてＰＣＲを行った。ＰＣＲは、９４℃で３分間の加熱の後、９４℃で１分間、６０℃で１分間、７２℃で１分間からなる反応を１サイクルとして３２サイクル行った。

また、各宿主細胞株由来ｃＤＮＡに代えて、実施例５の４項で得たＦＵＴ８スタンダードプラスミド５μＬ（０．１ｆｇ、１ｆｇ、５ｆｇ、１０ｆｇ、５０ｆｇ、１００ｆｇ、５００ｆｇ、１ｐｇ）を添加した系でＰＣＲを行い、ＦＵＴ８転写量の検量線作成に用いた。

β－アクチンの転写産物の定量は次の手順で行った。まず、実施例５の３項で得たチャイニーズハムスターβ－アクチンおよびラットβ－アクチンＯＲＦ全長の内部配列に対し、各遺伝子特異的なプライマーセット（前者を配列番号１５および配列番号１６に、後者を配列番号１７および配列番号１８に示す）をそれぞれ設計した。

次に、実施例５の１項で得られた各宿主細胞株由来のｃＤＮＡ溶液の５０倍希釈液５μＬおよび内部コントロール用プラスミド５μＬ（１ｐｇ）を含む総体積２０μＬの反応液［１倍濃度のＥｘＴａｑ　ｂｕｆｆｅｒ（宝酒造社製）、０．２ｍｍｏｌ／Ｌ　ｄＮＴＰｓ、０．５μｍｏｌ／Ｌ上記遺伝子特異的プライマー（配列番号１５および配列番号１６、または配列番号１７および配列番号１８）、５％ＤＭＳＯ］で、ＤＮＡポリメラーゼＥｘＴａｑ（宝酒造社製）を用いてＰＣＲを行った。ＰＣＲは、９４℃で３分間の加熱の後、９４℃で３０秒間、６５℃で１分間、７２℃で２分間から成る反応を１サイクルとした１７サイクルの条件で行った。

また、各宿主細胞株由来ｃＤＮＡに代えて、実施例５の５項で得たβ－アクチンスタンダードプラスミド５μＬ（１０ｐｇ、５ｐｇ、１ｐｇ、５００ｆｇ、１００ｆｇ）を添加した系でＰＣＲをそれぞれ行い、β－アクチン転写量の検量線作成に用いた。

第１表

ターゲット遺伝子	*プライマーセット	PCR増幅産物のサイズ（bp） ターゲット	コンペティター
FUT8	F：5’-GTCCATGGTGATCCTGCAGTGTGG-3’ R：5’-CACCAATGATATCTCCAGGTTCC-3’	638	431
β-actin (チャイニーズハムスター)	F：5’-GATATCGCTGCGCTCGTTGTCGAC-3’ R：5’-CAGGAAGGAAGGCTGGAAAAGAGC-3’	789	609
β-actin (ラット)	F：5’-GATATCGCTGCGCTCGTCGTCGAC-3’ R：5’-CAGGAAGGAAGGCTGGAAGAGAGC-3’	789	609

*F：フォワードプライマー、R：リバースプライマー

第１表に記載のプライマーセットを用いたＰＣＲにより、各遺伝子転写産物および各スタンダードから第１表のターゲット欄に示したサイズのＤＮＡ断片を、各内部コントロールから第１表のコンペティター欄に示したサイズのＤＮＡ断片を増幅させることができる。ＰＣＲ後の溶液のうち、７μＬを１．７５％アガロースゲル電気泳動に供した後、ゲルを１倍濃度のＳＹＢＲ Ｇｒｅｅｎ Ｉ Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄ Ｇｅｌ Ｓｔａｉｎ（Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｐｒｏｂｅｓ社製）に３０分間浸漬し染色した。増幅された各ＤＮＡ断片の発光強度をフルオロイメージャー（ＦｌｕｏｒＩｍａｇｅｒ ＳＩ；Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｄｙｎａｍｉｃｓ社製）で算出することにより、増幅されたＤＮＡ断片の量を測定した。

上記の方法により、スタンダードプラスミドを鋳型としたＰＣＲによって生じた増幅産物量を測定し、その測定値とスタンダードプラスミド量をプロットして検量線を作成した。この検量線を用いて、各発現株由来全ｃＤＮＡを鋳型とした場合の増幅産物の量より各株中の目的遺伝子ｃＤＮＡ量を算出し、これを各株におけるｍＲＮＡ転写量とした。

ラットＦＵＴ８配列をスタンダード、内部コントロールに用いた場合の各宿主細胞株におけるＦＵＴ８転写産物の量を第１６図に示した。培養期間を通じてＣＨＯ／ＤＧ４４細胞株はＹＢ２／０細胞株の１０倍以上の転写量を示した。この傾向は、チャイニーズハムスターＦＵＴ８配列をスタンダード、内部コントロールに用いた場合にも認められた。

また、第２表にβ－アクチン転写産物の量との相対値としてＦＵＴ８転写量を示した。培養期間を通じてＹＢ２／０細胞株のＦＵＴ８転写量がβ－アクチンの０．１％前後であるのに対し、ＣＨＯ／ＤＧ４４細胞株は０．５％～２％であった。

以上の結果より、ＹＢ２／０細胞株のＦＵＴ８転写産物量はＣＨＯ／ＤＧ４４細胞株のそれよりも有意に少ないことが示された。

第２表

細胞株	培養日数 1日目	2日目	3日目	4日目	5日目
CHO	1.95	0.90	0.57	0.52	0.54
YB2/0	0.12	0.11	0.14	0.08	0.07

実施例６．抗ＧＤ３キメラ抗体生産細胞株におけるＦＵＴ８遺伝子の転写物の定量

１．各種生産細胞株由来一本鎖ｃＤＮＡの調製

抗ＧＤ３キメラ抗体生産細胞ＤＣＨＩ０１－２０株および６１－３３株より、以下の手順で一本鎖ｃＤＮＡを調製した。ＤＣＨＩ０１－２０株は、実施例１の２項（２）記載のＣＨＯ／ＤＧ４４細胞由来の形質転換クローンである。また６１－３３株は、ＹＢ２／０由来の形質転換細胞クローン７－９－５１（独立行政法人産業技術総合研究所　特許生物寄託センター、ＦＥＲＭ　ＢＰ－６６９１）に対し無血清馴化を行った後、２回の限界希釈法によるクローン化を行って得たクローンである。

ＤＣＨＩ０１－２０株を３ｍｍｏｌ／Ｌ　Ｌ－Ｇｌｎ（Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ社製）、０．３％ＰＬＵＲＯＮＩＣ　Ｆ－６８（Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ社製）および０．５％脂肪酸濃縮液（Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ社製）を添加したＥＸＣＥＬＬ３０２培地（ＪＲＨ　ＢＩＯＳＣＩＥＮＣＥＳ社製）に懸濁し、２×１０^{5}個／ｍＬの密度で浮遊細胞培養用Ｔ７５フラスコ（Ｇｒｅｉｎｅｒ社製）に１５ｍＬ播種した。また、６１－３３株を０．２％ＢＳＡを添加したＨｙｂｒｉｄｏｍａ－ＳＦＭ培地（Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅ社製）に懸濁し、２×１０^{5}個／ｍＬの密度で浮遊細胞培養用Ｔ７５フラスコ（Ｇｒｅｉｎｅｒ社製）に１５ｍＬ播種した。これらを３７℃の５％CO_2インキュベーター内で培養し、培養１日目、２日目、３日目、４日目および５日目に各宿主細胞１×１０^{7}個を回収し、ＲＮＡｅａｓｙ（ＱＩＡＧＥＮ社製）により添付の説明書に従って全ＲＮＡを抽出した。

全ＲＮＡを４５μＬの滅菌水に溶解し、ＲＱ１　ＲＮａｓｅ－Ｆｒｅｅ　ＤＮａｓｅ（Ｐｒｏｍｅｇａ社製）１μ属の１０×ＤＮａｓｅ　ｂｕｆｆｅｒ　５μＬ、ＲＮａｓｉｎ　Ｒｉｂｏｎｕｃｌｅａｓｅ　ｉｎｈｉｂｉｔｏｒ（Ｐｒｏｍｅｇａ社製）０．５μＬをそれぞれに添加して、３７℃で３０分間反応させることにより、試料中に混入したゲノムＤＮＡを分解した。反応後、ＲＮＡｅａｓｙ（ＱＩＡＧＥＮ社製）により全ＲＮＡを再精製し、５０μＬの滅菌水に溶解した。

得られた全ＲＮＡ３μｇに対し、ＳＵＰＥＲＳＣＲＩＰＴ^{TM} Ｐｒｅａｍｐｌｉｆｉｃａｔｉｏｎ　Ｓｙｓｔｅｍ　ｆｏｒ　Ｆｉｒｓｔ　Ｓｔｒａｎｄ　ｃＤＮＡ　Ｓｙｎｔｈｅｓｉｓ（Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ社製）を用いて添付の説明書に従い、オリゴ（ｄＴ）をプライマーとした２０μＬの系で逆転写反応を行うことにより、一本鎖ｃＤＮＡを合成した。該反応液を水で５０倍希釈し、使用するまで－８０℃で保管した。

２．競合的ＰＣＲによる各遺伝子転写量の定量

実施例６の１項で得た抗体生産細胞株由来ｃＤＮＡに対し、実施例５の６項に準じて競合的ＰＣＲによる各遺伝子転写量の定量を行った。

各生産細胞株内のＦＵＴ８遺伝子由来のｍＲＮＡ転写量の定量は、以下の手順で行った。ＦＵＴ８転写量の定量の際に検量線に用いるスタンダードとして、実施例５の２項で得たチャイニーズハムスターＦＵＴ８およびラットＦＵＴ８のｃＤＮＡ部分断片をｐＣＲ２．１に組み込んだプラスミドであるＣＨＦＴ８－ｐＣＲ２．１およびＹＢＦＴ８－ｐＣＲ２．１を制限酵素ＥｃｏＲＩで切断し直鎖化したＤＮＡを用いた。

ＦＵＴ８定量の内部コントロールとしては、実施例５の４項で調製したＣＨＦＴ８ｄ－ｐＣＲ２．１およびＹＢＦＴ８ｄ－ｐＣＲ２．１のうち、チャイニーズハムスターＦＵＴ８およびラットＦＵＴ８の内部塩基配列のＳｃａＩ－ＨｉｎｄＩＩＩ間２０３ｂｐを欠失させることにより得られたＣＨＦＴ８ｄ－ｐＣＲ２．１およびＹＢＦＴ８ｄ－ｐＣＲ２．１を、制限酵素ＥｃｏＲＩで切断し直鎖化したＤＮＡを用いた。

実施例６の１項で得た各生産細胞株由来のｃＤＮＡ溶液の５０倍希釈液５μＬおよび内部コントロール用プラスミド５μＬ（１０ｆｇ）を含む総体積２０μＬの反応液［１倍濃度のＥｘＴａｑ　ｂｕｆｆｅｒ（宝酒造社製）、０．２ｍｍｏｌ／Ｌ　ｄＮＴＰｓ、０．５μｍｏｌ／Ｌ　ＦＵＴ８遺伝子特異的プライマー（配列番号１３および１４）、５％ＤＭＳＯ］で、ＤＮＡポリメラーゼＥｘＴａｑ（宝酒造社製）を用いてＰＣＲを行った。ＰＣＲは、９４℃で３分間の加熱の後、９４℃で１分間、６０℃で１分間、７２℃で１分間からなる反応を１サイクルとして３２サイクル行った。

また、各生産細胞株由来ｃＤＮＡに代えて、ＦＵＴ８スタンダードプラスミド５μＬ（０．１ｆｇ、１ｆｇ、５ｆｇ、１０ｆｇ、５０ｆｇ、１００ｆｇ、５００ｆｇ、１ｐｇ）を

添加した系でＰＣＲを行い、ＦＵＴ８転写量の検量線作成に用いた。尚、スタンダードプラスミドの希釈には１μｇ／ｍＬパン酵母由来ｔ－ＲＮＡ（ＳＩＧＭＡ社製）を用いた。一方、β－アクチン遺伝子は各細胞において恒常的に転写されており、その転写量は細胞間で同程度と考えられているため、各生産細胞株由来ｃＤＮＡ合成反応の効率の目安として、β－アクチン遺伝子の転写量を以下の手順で定量した。

β－アクチン遺伝子転写量の定量の際に検量線に用いるスタンダードとして、実施例５の３項で調製したチャイニーズハムスターβ－アクチンおよびラットβ－アクチンのｃＤＮＡのＯＲＦ全長をｐＢｌｕｅｓｃｒｉｐｔＩＩ　ＫＳ（＋）に組み込んだプラスミドであるＣＨＡｃ－ｐＢＳおよびＹＢＡｃ－ｐＢＳを制限酵素ＨｉｎｄＩＩＩおよびＫｐｎＩで切断し直鎖化したＤＮＡを用いた。

β－アクチン定量の内部コントロールとしては、実施例５の５項で調製した、ＣＨＡｃ－ｐＢＳおよびＹＢＡｃ－ｐＢＳのうちチャイニーズハムスターβ－アクチンおよびラットβ－アクチンの内部塩基配列のＤｒａＩＩＩ－ＤｒａＩＩＩ間１８０ｂｐを欠失させることにより得られたＣＨＡｃｄ－ｐＢＳおよびＹＢＡｃｄ－ｐＢＳを、制限酵素ＨｉｎｄＩＩおよびＫｐｎＩで切断し直鎖化したＤＮＡを用いた。

上記で得た各生産細胞株由来のｃＤＮＡ溶液の５０倍希釈液５μＬおよび内部コントロール用プラスミド５μＬ（１ｐｇ）を含む総体積２０μＬの反応液［１倍濃度のＥｘＴａｑ　ｂｕｆｆｅｒ（宝酒造社製）、０．２ｍｍｏｌ／Ｌ　ｄＮＴＰｓ、０．５μｍｏｌ／Ｌ　β－アクチン特異的プライマー（配列番号１７および１８）、５％ＤＭＳＯ］で、ＤＮＡポリメラーゼＥｘＴａｑ（宝酒造社製）を用いてＰＣＲを行った。ＰＣＲは、９４℃で３分間の加熱の後、９４℃で３０秒間、６５℃で１分間、７２℃で２分間から成る反応を１サイクルとした１７サイクルの条件で行った。また、各生産細胞株由来ｃＤＮＡに代えて、β－アクチンスタンダードプラスミド１０ｐｇ、５ｐｇ、１ｐｇ、５００ｆｇ、１００ｆｇを添加した系でＰＣＲをそれぞれ行い、β－アクチン転写量の検量線作成に用いた。尚、スタンダードプラスミドの希釈には１μｇ／ｍＬパン酵母由来ｔ－ＲＮＡ（ＳＩＧＭＡ社製）を用いた。

第１表に記載のプライマーセットを用いたＰＣＲにより、各遺伝子転写産物および各スタンダードから第１表のターゲット欄に示したサイズのＤＮＡ断片を、各内部コントロールから第１表のコンペティター欄に示したサイズのＤＮＡ断片を増幅させることができる。

ＰＣＲ後の溶液のうち、７μＬを１．７５％アガロースゲル電気泳動に供した後、ゲルを１倍濃度のＳＹＢＲ　Ｇｒｅｅｎ　Ｉ　Ｎｕｃｌｅｉｃ　Ａｃｉｄ　Ｇｅｌ　Ｓｔａｉｎ（Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｐｒｏｂｅｓ社製）に３０分間浸漬し染色した。増幅された各ＤＮＡ断片の発光強度をフルオロイメージャー（ＦｌｕｏｒＩｍａｇｅｒ　ＳＩ；Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｄｙｎａｍｉｃｓ社製）で算出することにより、増幅されたＤＮＡ断片の量を測定した。

上記の方法により、スタンダードプラスミドを鋳型としたＰＣＲによって生じた増幅産物量を測定し、その測定値とスタンダードプラスミド量をプロットして検量線を作成した。この検量線を用いて、各生産細胞株由来全ｃＤＮＡを鋳型とした場合の増幅産物の量より各株中の目的遺伝子ｃＤＮＡ量を算出し、これを各株におけるｍＲＮＡ転写量とした。

第３表にβ－アクチン転写産物の量との相対値としてＦＵＴ８転写量を示した。培養期間を通じて、ＹＢ２／０細胞由来抗体生産株６１－３３株のＦＵＴ８転写量がβ－アクチンの０．３％以下であるのに対し、ＣＨＯ細胞由来抗体生産株ＤＣＨＩ０１－２０株は０．７～１．５％であった。この結果より、ＹＢ２／０細胞由来抗体生産株のＦＵＴ８転写産物量はＣＨＯ細胞由来抗体生産株のそれよりも有意に少ないことが示された。

第３表

	培養日数				
細胞株	１日目	２日目	３日目	４日目	５日目
DCHI01-20	0.75	0.73	0.99	1.31	1.36
61-33	0.16	0.19	0.24	0.30	<0.10

実施例７．レクチン耐性ＣＨＯ／ＤＧ４４細胞の作製と該細胞を用いた抗体の生産

１．レクチン耐性ＣＨＯ／ＤＧ４４株の取得

ＣＨＯ／ＤＧ４４細胞を、ＩＭＤＭ－ＦＢＳ（１０）－ＨＴ（１）培地［ＦＢＳを１０％、ＨＴ ｓｕｐｐｌｅｍｅｎｔ（ＧＩＢＣＯ ＢＲＬ社製）を１倍濃度含むＩＭＤＭ培地］にて接着培養用フラスコ７５ｃｍ^2（グライナー社製）中で培養し、コンフルエント直前まで増殖させた。５ｍＬのＰＢＳ（インビトロジェン社製）にて細胞を洗浄後、ＰＢＳで希釈した０．０５％トリプシン（インビトロジェン社製）を１．５ｍＬ添加して３７℃にて５分間放置し、細胞を培養器底面から剥離させた。剥離させた細胞を通常の細胞培養で行われる遠心操作により回収し、１（１０^{5}細胞／ｍＬの密度になるようにＩＭＤＭ－ＦＢＳ（１０）－ＨＴ（１）培地を添加して懸濁後、未添加または０．１μｇ／ｍＬのアルキル化剤であるＮ－ｍｅｔｈｙｌ－Ｎ’－ｎｉｔｒｏ－Ｎ－ｎｉｔｒｏｓｏｇｕａｎｉｄｉｎ（以下、ＭＮＮＧと表記、Ｓｉｇｍａ社製）を添加した。CO_2インキュベータ（ＴＡＢＡＩ製）内で３７℃にて３日間放置後、培養上清を除き、再び上述した操作と同様の操作で細胞を洗浄、剥離、回収し、ＩＭＤＭ－ＦＢＳ（１０）－ＨＴ（１）培地に懸濁後、接着培養用９６ウェルプレート（岩城硝子社製）に１×１０^{3}細胞／ウエルの密度で播種した。各ウエルには培地中終濃度で１ｍｇ／ｍＬのレンズマメ凝集素（Ｌｅｎｓｃｕｌｉｎａｒｉｓ ａｇｇｌｕｔｉｎｉｎ；以下、ＬＣＡと表記、Ｖｅｃｔｏｒ社製）、あるいは１ｍｇ／ｍＬのヒイロチャワンタケ凝集素（Ａｌｅｕｒｉａ ａｕｒａｎｔｉａ Ｌｅｃｔｉｎ；以下、ＡＡＬと表記、Ｖｅｃｔｏｒ社製）、あるいは１ｍｇ／ｍＬのインゲンマメ凝集素（Ｐｈａｓｅｏｌｕｓ ｖｕｌｇａｒｉｓＬｅｕｃｏａｇｇｌｕｔｉｎｉｎ；以下、Ｌ－ＰＨＡと表記、Ｖｅｃｔｏｒ社製）を添加した。CO_2インキュベータ内で３７℃にて２週間培養後、出現したコロニーをレクチン耐性ＣＨＯ／ＤＧ４４株として取得した。取得したそれぞれのレクチン耐性ＣＨＯ／ＤＧ４４株については、ＬＣＡ耐性株をＣＨＯ－ＬＣＡ株、ＡＡＬ耐性株をＣＨＯ－ＡＡＬ株、Ｌ－ＰＨＡ耐性株をＣＨＯ－ＰＨＡ株と名付けた。取得したこれら株の各種レクチンに対する耐性を調べたところ、ＣＨＯ－ＬＣＡ株はＡＡＬに対しても耐性であり、ＣＨＯ－ＡＡＬ株はＬＣＡに対しても耐性であることが分かった。さらに、ＣＨＯ－ＬＣＡ株およびＣＨＯ－ＡＡＬ株は、ＬＣＡやＡＡＬが認識する糖鎖構造と同じ糖鎖構造を認識するレクチン、すなわち、Ｎ－グリコシド結合糖鎖還元末端のＮ－アセチルグルコサミン残基の１位とフコースの６位がα結合で付加された糖鎖構造を認識するレクチンに対しても耐性を示した。具体的には、終濃度１ｍｇ／ｍＬのエンドウマメ凝集素（Ｐｉｓｕｍ ｓａｔｉｖｕｍ Ａｇｇｌｕｔｉｎｉｎ；以下、ＰＳＡと表記、Ｖｅｃｔｏｒ社製）が添加された培地でもＣＨＯ－ＬＣＡ株およびＣＨＯ－ＡＡＬ株は耐性を示し生存することが分かった。また、アルキル化剤ＭＮＮＧ無添加の場合でも、上述の処理を施す細胞数を増やすことでレクチン耐性株を取得することが可能であった。以後、これら株を解析に用いた。

２．抗ＣＣＲ４キメラ抗体生産細胞の作製

実施例７の１項で得られた３種類のレクチン耐性株に、実施例４に記載した方法で、抗ＣＣＲ４キメラ抗体発現プラスミドｐＫＡＮＴＥＸ２１６０を導入し、薬剤ＭＴＸによる遺伝子増幅を行い、抗ＣＣＲ４キメラ抗体生産株を作製した。抗体発現量の測定は実施例４の２項に記載したＥＬＩＳＡ法を用いて行い、ＣＨＯ－ＬＣＡ株、ＣＨＯ－ＡＡＬ株、Ｃ

ＨＯ－ＰＨＡ株、それぞれから抗体を発現した形質転換株を取得した。取得したそれぞれの形質転換株については、ＣＨＯ－ＬＣＡ株由来の形質転換株をＣＨＯ／ＣＣＲ４－ＬＣＡ株、ＣＨＯ－ＡＡＬ株由来の形質転換株をＣＨＯ／ＣＣＲ４－ＡＡＬ株、ＣＨＯ－ＰＨＡ株由来の形質転換株をＣＨＯ／ＣＣＲ４－ＰＨＡ株と名付けた。なおＣＨＯ／ＣＣＲ４－ＬＣＡ株はＮｅｇａ－１３の株名で、平成１３年９月２６日付けで独立行政法人産業技術総合研究所　特許生物寄託センター（日本国茨城県つくば市東１丁目１番地中央第６）にＦＥＲＭ　ＢＰ－７７５６として寄託されている。

３．レクチン耐性ＣＨＯ細胞による高ＡＤＣＣ活性抗体の生産

実施例７の２項で得られた３種類の形質転換株を用い、実施例４の３項に記載した方法で精製抗体を取得した。精製した抗ＣＣＲ４キメラ抗体の抗原結合活性は実施例４の２項に記載したＥＬＩＳＡ法を用いて評価した。いずれの形質転換株が生産する抗体も、実施例４で作製した通常のＣＨＯ／ＤＧ４４細胞を宿主とした生産株５－０３株が生産する抗体と同等の抗原結合活性を示した。それら精製抗体を用い、実施例４の７項に記載した方法に従って各抗ＣＣＲ４キメラ抗体のＡＤＣＣ活性を評価した。その結果を第１７図に示した。５－０３株が生産した抗体と比較して、ＣＨＯ／ＣＣＲ４－ＬＣＡ株およびＣＨＯ／ＣＣＲ４－ＡＡＬ株が生産した抗体では、約１００倍程度のＡＤＣＣ活性の上昇が観察された。一方、ＣＨＯ／ＣＣＲ４－ＰＨＡ株が生産した抗体では有意なＡＤＣＣ活性の上昇は観察されなかった。また、ＣＨＯ／ＣＣＲ４－ＬＣＡ株とＹＢ２／０細胞由来の生産株が生産した抗体のＡＤＣＣ活性を実施例４の７項に記載した方法に従って比較したところ、ＣＨＯ／ＣＣＲ４－ＬＣＡ株が生産した抗体は実施例４の１項で作製したＹＢ２／０細胞由来生産株が生産した抗体ＫＭ２７６０－１と同様の高いＡＤＣＣ活性を示すことが明らかとなった（第１８図）。

４．レクチン耐性ＣＨＯ細胞が生産する抗体の糖鎖分析

実施例７の３項で精製した抗ＣＣＲ４キメラ抗体の糖鎖分析を実施例３の１項に記載の方法に従って行った。第１９図に各種抗ＣＣＲ４キメラ抗体の精製ＰＡ化糖鎖群の溶離図を示した。

第４表には、各種レクチン耐性株が生産した抗ＣＣＲ４キメラ抗体の糖鎖分析の結果得られた還元末端のＮ－アセチルグルコサミンの６位にフコースの１位がα結合していない糖鎖の割合（％）を示す。

第４表

抗体生産細胞	α1,6-フコースを持たない糖鎖の割合（%）
5-03 株	9
CHO/CCR4-LCA 株	48
CHO/CCR4-AAL 株	27
CHO/CCR4-PHA 株	8

５－０３株が生産した抗体と比較して、ＣＨＯ／ＣＣＲ４－ＬＣＡ株が生産した抗体では、還元末端のＮ－アセチルグルコサミンの６位にフコースの１位がα結合していない糖鎖の割合が、９％から４８％まで上昇していた。ＣＨＯ／ＣＣＲ４－ＡＡＬ株が生産した抗体では、α１，６－フコースを持たない糖鎖の割合が、９％から２７％まで上昇していた。一方、ＣＨＯ／ＣＣＲ４－ＰＨＡ株では５－０３株と比較して、糖鎖パターンおよびα１，６－フコースを持たない糖鎖の割合に殆ど変化は認められなかった。

実施例８．レクチン耐性ＣＨＯ細胞株の解析

１．抗ＣＣＲ４キメラ抗体生産ＣＨＯ／ＣＣＲ４－ＬＣＡ株におけるＧＭＤ酵素の発現量解析

実施例７で取得した抗ＣＣＲ４キメラ抗体生産ＣＨＯ／ＣＣＲ４－ＬＣＡ株における、フコース生合成酵素として知られるＧＭＤ、ＧＦＰＰ、ＦＸ、およびフコース転移酵素であるＦＵＴ８の各遺伝子の発現量を、ＲＴ－ＰＣＲ法を用いて解析した。

（１）各種細胞株からのＲＮＡ調製

ＣＨＯ／ＤＧ４４細胞、実施例４の１項（２）で取得した抗ＣＣＲ４キメラ抗体生産細胞株５－０３株、実施例７の２項で取得した抗ＣＣＲ４キメラ抗体生産細胞株ＣＨＯ／ＣＣＲ４－ＬＣＡ株をそれぞれ３７℃の５％CO_2インキュベーター内にて継代後４日間培養した。培養後、ＲＮｅａｓｙ Ｐｒｏｔｅｃｔ Ｍｉｎｉ ｋｉｔ（キアゲン社製）を用いて、各1×10^7細胞より添付の使用説明書に従ってＲＮＡを調製した。続いて、ＳＵＰＥＲ ＳＣＲＩＰＴ Ｆｉｒｓｔ－Ｓｔｒａｎｄ ｓｙｎｔｈｅｓｉｓ ｓｙｓｔｅｍ ｆｏｒ ＲＴ－ＰＣＲ（ＧＩＢＣＯ ＢＲＬ社製）を用い、添付の使用説明書に従って各ＲＮＡ５μｇより２０μＬの反応液中にて一本鎖ｃＤＮＡを合成した。

（２）ＲＴ－ＰＣＲ法を用いたＧＭＤ遺伝子の発現量解析

ＧＭＤ ｃＤＮＡをＰＣＲ法によって増幅するために、参考例２の１項で示すＣＨＯ細胞由来ＧＭＤ ｃＤＮＡ配列より、配列番号３２で示される塩基配列を有する２４ｍｅｒの合成ＤＮＡプライマーと配列番号３３で示される塩基配列を有する２６ｍｅｒの合成ＤＮＡプライマーを作製した。

続いて、実施例８の１項（１）で作製した各細胞株由来の一本鎖ｃＤＮＡ ０．５μＬを鋳型として含む２０μＬの反応液［１倍濃度のＥＸ Ｔａｑ Ｂｕｆｆｅｒ（宝酒造社製）、０．２ｍｍｏｌ／ＬのｄＮＴＰｓ、０．５単位のＥＸ Ｔａｑ ｐｏｌｙｍｅｒａｓｅ（宝酒造社製）、０．５μｍｏｌ／Ｌの配列番号３２と３３の合成ＤＮＡプライマー］を調製し、ＤＮＡサーマルサイクラー４８０（パーキンエルマー社製）を用いて、９４℃にて５分間加熱した後９４℃にて１分間、６８℃にて２分間のサイクルを３０サイクル行なった。上記の該ＰＣＲ反応液１０μＬをアガロース電気泳動した後、サイバーグリーン（ＢＭＡ社製）を用いてＤＮＡ断片を染色し、予想される約３５０ｂｐのＤＮＡ断片量をＦｌｕｏｒ Ｉｍａｇｅｒ ＳＩ（モレキュラーダイナミクス社製）を用いて測定した。

（３）ＲＴ－ＰＣＲ法を用いたＧＦＰＰ遺伝子の発現量解析

ＧＦＰＰ ｃＤＮＡをＰＣＲ法によって増幅するために、参考例１の２項で取得したＣＨＯ細胞由来ＧＦＰＰのｃＤＮＡ配列に基づいて、配列番号３４で示される塩基配列を有する２７ｍｅｒの合成ＤＮＡプライマーと配列番号３５で示される塩基配列を有する２３ｍｅｒの合成ＤＮＡプライマーを作製した。

続いて、実施例８の１項（１）で作製した各細胞株由来の一本鎖ｃＤＮＡ ０．５μＬを鋳型として含む２０μＬの反応液［１倍濃度のＥＸ Ｔａｑ Ｂｕｆｆｅｒ（宝酒造社製）、０．２ｍｍｏｌ／ＬのｄＮＴＰｓ、０．５単位のＥＸ Ｔａｑ ｐｏｌｙｍｅｒａｓｅ（宝酒造社製）、０．５μｍｏｌ／Ｌの配列番号３４と３５の合成ＤＮＡプライマー］を調製し、ＤＮＡサーマルサイクラー４８０（パーキンエルマー社製）を用いて、９４℃にて５分間加熱した後９４℃にて１分間、６８℃にて２分間のサイクルを２４サイクル行なった。上記の該ＰＣＲ反応液１０μＬをアガロース電気泳動した後、サイバーグリーン（ＢＭＡ社製）を用いてＤＮＡ断片を染色し、予想される約６００ｂｐのＤＮＡ断片量をＦｌｕｏｒ Ｉｍａｇｅｒ ＳＩ（モレキュラーダイナミクス社製）を用いて測定した。

（４）ＲＴ－ＰＣＲ法を用いたＦＸ遺伝子の発現量解析

ＦＸ ｃＤＮＡをＰＣＲ法によって増幅するために、参考例１の１項で取得したＣＨＯ細胞由来ＦＸのｃＤＮＡ配列に基づいて、配列番号３６で示される塩基配列を有する２８ｍｅｒの合成ＤＮＡプライマーと配列番号３７で示される塩基配列を有する２８ｍｅｒの合成ＤＮＡプライマーを作製した。

続いて、実施例８の１項（１）で作製した各細胞株由来の一本鎖ｃＤＮＡ ０．５μＬを鋳型として含む２０μＬの反応液［１倍濃度のＥＸ Ｔａｑ Ｂｕｆｆｅｒ（宝酒造社製）、０．２ｍｍｏｌ／ＬのｄＮＴＰｓ、０．５単位のＥＸ Ｔａｑ ｐｏｌｙｍｅｒａｓｅ（宝酒造社製）、０．５μｍｏｌ／Ｌの配列番号３６と３７の合成ＤＮＡプライマー］を調製し、ＤＮＡサーマルサイクラー４８０（パーキンエルマー社製）を用いて、９４℃にて５分間加熱した後９４℃にて１分間、６８℃にて２分間のサイクルを２２サイクル行なった。上記の該ＰＣＲ反応液１０μＬをアガロース電気泳動した後、サイバーグリーン（ＢＭＡ社製）を用いてＤＮＡ断片を染色し、予想される約３００ｂｐのＤＮＡ断片量をＦｌｕｏｒ Ｉｍａｇｅｒ ＳＩ（モレキュラーダイナミクス社製）を用いて測定した。

（５）ＲＴ－ＰＣＲ法を用いたＦＵＴ８遺伝子の発現量解析
ＦＵＴ８ ｃＤＮＡをＰＣＲ法によって増幅するために、実施例８の１項（１）で作製した各細胞株由来の一本鎖ｃＤＮＡ ０．５μＬを鋳型として含む２０μＬの反応液［１倍濃度のＥＸ Ｔａｑ Ｂｕｆｆｅｒ（宝酒造社製）、０．２ｍｍｏｌ／ＬのｄＮＴＰｓ、０．５単位のＥＸ Ｔａｑｐｏｌｙｍｅｒａｓｅ（宝酒造社製）、０．５μｍｏｌ／Ｌの配列番号１３と１４の合成ＤＮＡプライマー］を調製し、ＤＮＡサーマルサイクラー４８０（パーキンエルマー社製）を用いて、９４℃にて５分間加熱した後９４℃にて１分間、６８℃にて２分間のサイクルを２０サイクル行なった。上記の該ＰＣＲ反応液１０μＬをアガロース電気泳動した後、サイバーグリーン（ＢＭＡ社製）を用いてＤＮＡ断片を染色し、予想される約６００ｂｐのＤＮＡ断片量をＦｌｕｏｒ Ｉｍａｇｅｒ ＳＩ（モレキュラーダイナミクス社製）を用いて測定した。
（６）ＲＴ－ＰＣＲ法を用いたβ－アクチン遺伝子の発現量解析
β－アクチンｃＤＮＡをＰＣＲ法によって増幅するために、実施例８の１項（１）で作製した各細胞株由来の一本鎖ｃＤＮＡ ０．５μＬを鋳型として含む２０μＬの反応液［１倍濃度のＥＸ Ｔａｑ Ｂｕｆｆｅｒ（宝酒造社製）、０．２ｍｍｏｌ／ＬのｄＮＴＰｓ、０．５単位のＥＸ Ｔａｑｐｏｌｙｍｅｒａｓｅ（宝酒造社製）、０．５μｍｏｌ／Ｌの配列番号１５と１６の合成ＤＮＡプライマー］を調製し、ＤＮＡサーマルサイクラー４８０（パーキンエルマー社製）を用いて、９４℃にて５分間加熱した後、９４℃にて１分間、６８℃にて２分間のサイクルを１４サイクル行なった。上記の該ＰＣＲ反応液１０μＬをアガロース電気泳動した後、サイバーグリーン（ＢＭＡ社製）を用いてＤＮＡ断片を染色し、予想される約８００ｂｐのＤＮＡ断片量をＦｌｕｏｒ Ｉｍａｇｅｒ ＳＩ（モレキュラーダイナミクス社製）を用いて測定した。
（７）各細胞株におけるＧＭＤ、ＧＦＰＰ、ＦＸ、ＦＵＴ８遺伝子の発現量
実施例８の１項（２）から（６）で測定した各細胞株におけるＧＭＤ、ＧＦＰＰ、ＦＸ、ＦＵＴ８ｃＤＮＡ由来ＰＣＲ増幅断片量の値を、各細胞株におけるβ－アクチンのｃＤＮＡ由来ＰＣＲ増幅断片量の値で割り、ＣＨＯ／ＤＧ４４細胞におけるＰＣＲ増幅断片量を１とした場合の５－０３株およびＣＨＯ／ＣＣＲ４－ＬＣＡ株における各遺伝子のＰＣＲ増幅断片量を求めた。結果を第５表に示す。

第５表

	GMD	GEPP	FX	FUT8
CHO/DG44 株	1	1	1	1
CHO/DG44 株 抗 CCR4 抗体生産細胞 5-03 株	1.107	0.793	1.093	0.901
5-03 株由来 LCA 耐性細胞 CHO/CCR4-LCA	0.160	0.886	0.920	0.875

第５表で示したようにＣＨＯ／ＣＣＲ４－ＬＣＡ株のＧＭＤ遺伝子の発現量が他の細胞株と比べ１／１０程度に低下していた。なお、本実験は独立して２回行い、その平均値を使用した。
２．ＧＭＤ遺伝子を強制発現させた抗ＣＣＲ４キメラ抗体生産ＣＨＯ／ＣＣＲ４－ＬＣＡ株を用いた解析
（１）ＣＨＯ細胞由来ＧＭＤ遺伝子発現ベクターｐＡＧＥ２４９ＧＭＤの構築
参考例２の１項で取得したＣＨＯ細胞由来ＧＭＤのｃＤＮＡ配列に基づいて、配列番号３

８で示される塩基配列を有する２８ｍｅｒのプライマー、および配列番号３９で示される塩基配列を有する２９ｍｅｒのプライマーを作製した。続いて、実施例８の１項（１）で作製したＣＨＯ細胞由来一本鎖ｃＤＮＡ　０．５μＬを鋳型として含む２０μＬの反応液［１倍濃度のＥＸ　Ｔａｑ　Ｂｕｆｆｅｒ（宝酒造社製）、０．２ｍｍｏｌ／Ｌ　ｄＮＴＰｓ、０．５単位のＥＸ　Ｔａｑ　ｐｏｌｙｍｅｒａｓｅ（宝酒造社製）、０．５μｍｏｌ／Ｌの配列番号３８と３９の合成ＤＮＡプライマー］を調製し、ＤＮＡサーマルサイクラー４８０（パーキンエルマー社製）を用いて、９４℃にて５分間加熱した後９４℃にて１分間、５８℃にて１分間、７２℃にて１分間のサイクルを８サイクル反復した後、さらに９４℃にて１分間、６８℃にて２分間のサイクルを２２サイクル反復した。反応終了後、該ＰＣＲ反応液をアガロース電気泳動にて分画後、約６００ｂｐのＤＮＡ断片を回収した。回収したＤＮＡ断片はＤＮＡＬｉｇａｔｉｏｎ　ｋｉｔ（宝酒造社製）を用いてｐＴ７Ｂｌｕｅ（Ｒ）ベクター（Ｎｏｖａｇｅｎ社製）に連結し、得られた組換えプラスミドＤＮＡを用いて大腸菌ＤＨ５α株（東洋紡績社製）を形質転換し、プラスミドｍｔ－Ｃを得た（第２０図）。

次に、参考例２の１項で取得したＣＨＯ細胞由来ＧＭＤのｃＤＮＡ配列に基づいて、配列番号４０で示される塩基配列を有する４５ｍｅｒのプライマー、および配列番号４１で示される塩基配列を有する３１ｍｅｒのプライマーを作製した。続いて、実施例８の１項（１）で作製したＣＨＯ細胞由来一本鎖ｃＤＮＡ　０．５μＬを鋳型として含む２０μＬの反応液［１倍濃度のＥＸ　Ｔａｑ　Ｂｕｆｆｅｒ（宝酒造社製）、０．２ｍｍｏｌ／Ｌ　ｄＮＴＰｓ、０．５単位のＥＸ　Ｔａｑ　ｐｏｌｙｍｅｒａｓｅ（宝酒造社製）、０．５μｍｏｌ／Ｌの配列番号４０と４１の合成ＤＮＡプライマー］を調製し、ＤＮＡサーマルサイクラー４８０（パーキンエルマー社製）を用いて、９４℃にて５分間加熱した後９４℃にて１分間、５７℃にて１分間、７２℃にて１分間のサイクルを８サイクル反復した後、さらに９４℃にて１分間、６８℃にて２分間のサイクルを２２サイクル反復した。反応終了後、該ＰＣＲ反応液をアガロース電気泳動にて分画後、約１５０ｐのＤＮＡ断片を回収した。回収したＤＮＡ断片はＤＮＡＬｉｇａｔｉｏｎ　ｋｉｔ（宝酒造社製）を用いてｐＴ７Ｂｌｕｅ（Ｒ）ベクター（Ｎｏｖａｇｅｎ社製）に連結し、得られた組換えプラスミドＤＮＡを用いて大腸菌ＤＨ５α株（東洋紡績社製）を形質転換し、プラスミドＡＴＧを得た（第２１図）。

次に、参考例２の１項に記載のプラスミドＣＨＯ－ＧＭＤの３μｇを制限酵素ＳａｃＩ（宝酒造社製）で３７℃にて１６時間反応後、フェノール／クロロホルム抽出およびエタノール沈殿を行なってＤＮＡを回収し、制限酵素ＥｃｏＲＩ（宝酒造社製）で３７℃にて１６時間反応後アガロース電気泳動にて分画後、約９００ｂｐのＤＮＡ断片を回収した。上記で得られたプラスミドｍｔ－Ｃの１．４μｇを制限酵素ＳａｃＩ（宝酒造社製）で３７℃にて１６時間反応後、フェノール／クロロホルム抽出およびエタノール沈殿を行なってＤＮＡを回収し、制限酵素ＥｃｏＲＩ（宝酒造社製）で３７℃にて１６時間反応後アガロース電気泳動にて分画し、約３．１ｋｂｐのＤＮＡ断片を回収した。それぞれ回収したＤＮＡ断片をＤＮＡ　Ｌｉｇａｔｉｏｎ　ｋｉｔ（宝酒造社製）を用いて連結し、得られた組換えプラスミドＤＮＡを用いて大腸菌ＤＨ５α株を形質転換し、プラスミドＷＴ－Ｎ（－）を得た（第２２図）。

次に、プラスミドＷＴ－Ｎ（－）の２μｇを制限酵素ＢａｍＨＩ（宝酒造社製）で３７℃にて１６時間反応後、フェノール／クロロホルム抽出およびエタノール沈殿を行なってＤＮＡを回収し、制限酵素ＥｃｏＲＩ（宝酒造社製）で３７℃にて１６時間反応後アガロース電気泳動にて分画し、約１ｋｂｐのＤＮＡ断片を回収した。プラスミドｐＢｌｕｅｓｃｒｉｐｔＳＫ（－）（Ｓｔｒａｔａｇｅｎｅ社製）の３μｇを制限酵素ＢａｍＨＩ（宝酒造社製）で３７℃にて１６時間反応後、フェノール／クロロホルム抽出およびエタノール沈殿を行なってＤＮＡを回収し、制限酵素ＥｃｏＲＩ（宝酒造社製）で３７℃にて１６時間反応後アガロース電気泳動にて分画し、約３ｋｂｐのＤＮＡ断片を回収した。それぞれ回収したＤＮＡ断片をＤＮＡ　Ｌｉｇａｔｉｏｎ　ｋｉｔ（宝酒造社製）を用いて連結し、得られた組換えプラスミドＤＮＡを用いて大腸菌ＤＨ５α株を形質転換し、プラスミド

ＷＴ－Ｎ（－）ｉｎｐＢＳを得た（第２３図）。
次に、プラスミドＷＴ－Ｎ（－）ｉｎ　ｐＢＳの２μｇを制限酵素ＨｉｎｄＩＩＩ（宝酒造社製）で３７℃にて１６時間反応後、フェノール／クロロホルム抽出およびエタノール沈殿を行なってＤＮＡを回収し、制限酵素ＥｃｏＲＩ（宝酒造社製）で３７℃にて１６時間反応後アガロース電気泳動にて分画し、約４ｋｂｐのＤＮＡ断片を回収した。上記で得られたプラスミドＡＴＧの２μｇを制限酵素ＨｉｎｄＩＩＩ（宝酒造社製）で３７℃にて１６時間反応後、フェノール／クロロホルム抽出およびエタノール沈殿を行なってＤＮＡを回収し、制限酵素ＥｃｏＲＩ（宝酒造社製）で３７℃にて１６時間反応後アガロース電気泳動にて分画し、約１５０ｂｐのＤＮＡ断片を回収した。それぞれ回収したＤＮＡ断片をＤＮＡ　Ｌｉｇａｔｉｏｎ　ｋｉｔ（宝酒造社製）を用いて連結し、得られた組換えプラスミドＤＮＡを用いて大腸菌ＤＨ５α株を形質転換し、プラスミドＷＴ　ｉｎ　ｐＢＳを得た（第２４図）。
次に、プラスミドｐＡＧＥ２４９の２μｇを制限酵素ＨｉｎｄＩＩＩとＢａｍＨＩ（共に宝酒造社製）で３７℃にて１６時間反応後アガロース電気泳動にて分画し、約６．５ｋｂｐのＤＮＡ断片を回収した。プラスミドＷＴ　ｉｎ　ｐＢＳの２μｇを制限酵素ＨｉｎｄＩＩＩとＢａｍＨＩ（共に宝酒造社製）で３７℃にて１６時間反応後アガロース電気泳動にて分画し、約１．２ｋｂｐのＤＮＡ断片を回収した。それぞれ回収したＤＮＡ断片をＤＮＡ　Ｌｉｇａｔｉｏｎ　ｋｉｔ（宝酒造社製）を用いて連結し、得られた組換えプラスミドＤＮＡを用いて大腸菌ＤＨ５α株を形質転換し、プラスミドｐＡＧＥ２４９ＧＭＤを得た（第２５図）。
（２）ＣＨＯ／ＣＣＲ４－ＬＣＡ株におけるＧＭＤ遺伝子の安定発現
制限酵素ＦｓｐＩ（ＮＥＷ　ＥＮＧＬＡＮＤ　ＢＩＯＬＡＢＳ社製）で切断することにより直鎖状としたＣＨＯ細胞由来ＧＭＤ遺伝子発現ベクターｐＡＧＥ２４９ＧＭＤの５μｇ、１．６×10^6細胞のＣＨＯ／ＣＣＲ４－ＬＣＡ株へエレクトロポレーション法［サイトテクノロジー（Ｃｙｔｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ），３，１３３（１９９０）］により導入後、ＭＴＸ（ＳＩＧＭＡ社製）を２００ｎｍｏｌ／Ｌの濃度で含む３０ｍＬのＩＭＤＭ－ｄＦＢＳ（１０）培地［１０％ｄＦＢＳを含むＩＭＤＭ培地（ＧＩＢＣＯ　ＢＲＬ社製）］に懸濁し、１８２ｃｍ^{2}フラスコ（Ｇｒｅｉｎｅｒ社製）にて３７℃の５％CO_2インキュベーター内で２４時間培養した。培養後、ハイグロマイシンを０．５ｍｇ／ｍＬ、ＭＴＸ（ＳＩＧＭＡ社製）を２００ｎｍｏｌ／Ｌの濃度で含むＩＭＤＭ－ｄＦＢＳ（１０）培地に培地交換してさらに１９日間培養し、ハイグロマイシン耐性を示す形質転換株のコロニー群を取得した。
また同様に、ｐＡＧＥ２４９ベクターを上記と同じ方法でＣＨＯ／ＣＣＲ４－ＬＣＡ株へ導入し、ハイグロマイシン耐性を示す形質転換株のコロニー群を取得した。
（３）ＧＭＤ遺伝子を発現させたＣＨＯ／ＣＣＲ４－ＬＣＡ株の培養および抗体の精製
実施例８の２項（２）で取得したＧＭＤを発現している形質転換細胞群をＭＴＸ（ＳＵＧＭＡ社製）を２００ｎｍｏｌ／Ｌ、ハイグロマイシンを０．５ｍｇ／ｍＬの濃度で含むＩＭＤＭ－ｄＦＢＳ（１０）培地を用いて、１８２ｃｍ^{2}フラスコ（Ｇｒｅｉｎｅｒ社製）にて３７℃の５％CO_2インキュベーター内で培養した。数日後、細胞密度がコンフルエントに達した時点で培養上清を除去し、２５ｍＬのＰＢＳ（ＧＩＢＣＯ　ＢＲＬ社製）にて細胞を洗浄後、ＥＸＣＥＬＬ３０１培地（ＪＲＨ社製）を３５ｍＬ注入した。３７℃の５％CO_2インキュベーター内で７日間培養後、培養上清を回収した。培養上清よりＰｒｏｓｅｐ－Ａ（ミリポア社製）カラムを用いて、添付の説明書に従い、抗ＣＣＲ４キメラ抗体を精製した。
また同様に、ｐＡＧＥ２４９ベクターを導入した形質転換細胞群を上記と同じ方法で培養後、培養上清より抗ＣＣＲ４キメラ抗体を回収、精製した。
（４）形質転換細胞群におけるレクチン耐性度の測定
実施例８の２項（２）で取得したＧＭＤ遺伝子を発現している形質転換細胞群を、ＭＴＸ（ＳＵＧＭＡ社製）を２００ｎｍｏｌ／Ｌ、ハイグロマイシンを０．５ｍｇ／ｍＬの濃度で含むＩＭＤＭ－ｄＦＢＳ（１０）培地に６×10^4細胞／ｍＬになるように懸濁し、９

６ウェル培養用プレート（岩城硝子社製）に５０μＬ／ウェルずつ分注した。続いて、このウェルにＭＴＸ（ＳＵＧＭＡ社製）を２００ｎｍｏｌ／Ｌ、ハイグロマイシンを０．５ｍｇ／ｍＬの濃度で含むＩＭＤＭ－ｄＦＢＳ（１０）培地に０ｍｇ／ｍＬ、０．４ｍｇ／ｍＬ、１．６ｍｇ／ｍＬ、４ｍｇ／ｍＬの濃度でＬＣＡ（ＬＥＮＳＣＵＬＩＮＡＲＩＳ ＡＧＧＬＵＴＩＮＩＮ：Ｖｅｃｔｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ社製）を添加した培地を５０μＬずつ加え、３７℃の５％CO_2インキュベーター内で９６時間培養した。培養後、ＷＳＴ－１（ベーリンガー社製）を１０μＬ／ウェルになるよう加え、３７℃の５％CO_2インキュベーター内で３０分間放置して発色させたのち、マイクロプレートリーダー（ＢＩＯ－ＲＡＤ社製）にて４５０ｎｍと５９５ｎｍの吸光度（以下ＯＤ４５０、ＯＤ５９５と表記する）を測定した。また同様に、ｐＡＧＥ２４９ベクターを導入した形質転換細胞群も上記と同じ方法で測定した。以上の実験は独立して２回行なった。

上記で測定したＯＤ４５０からＯＤ５９５を引いた値を各細胞群の生存数とし、ＬＣＡを加えていないウェルの細胞生存数を１００％とした場合の各ウェルの細胞生存数を％で表記し第２６図に示した。第２６図に示したように、ＧＭＤを発現させたＣＨＯ／ＣＣＲ４－ＬＣＡ株ではＬＣＡ耐性度の低下が観察され、０．２ｍｇ／ｍＬのＬＣＡ存在下での細胞生存率は約４０％、０．８ｍｇ／ｍＬのＬＣＡ存在下での細胞生存率は約２０％であった。一方、ｐＡＧＥ２４９ベクターを導入したＣＨＯ／ＣＣＲ４－ＬＣＡ株では、０．２ｍｇ／ｍＬのＬＣＡ存在下での細胞生存率は１００％、０．８ｍｇ／ｍＬのＬＣＡ存在下においても細胞生存率は約８０％であった。以上の結果より、ＣＨＯ／ＣＣＲ４－ＬＣＡ株はＧＭＤ遺伝子の発現量が低下しており、その結果ＬＣＡに対する耐性を獲得していることが示唆された。

（５）ＧＭＤを発現させたＣＨＯ／ＣＣＲ４－ＬＣＡ株より取得した抗ＣＣＲ４キメラ抗体のＡＤＣＣ活性

実施例８の２項（３）で得られた精製抗ＣＣＲ４キメラ抗体のＡＤＣＣ活性を以下に示す方法に従い、測定した。

ｉ）標的細胞溶液の調製

ＷＯ０１／６４７５４に記載のＣＣＲ４／ＥＬ－４細胞の1×10^6細胞を調製し、放射性物質である$Na_2{}^{51}CrO_4$を３．７ＭＢｑ当量加えて３７℃で９０分間反応させ、細胞を放射線標識した。反応後、ＲＰＭＩ１６４０－ＦＢＳ（１０）培地で懸濁および遠心分離操作により3回洗浄し、培地に再懸濁し、４℃で３０分間氷中に放置して放射性物質を自然解離させた。遠心分離後、ＲＰＭＩ１６４０－ＦＢＳ（１０）培地を５ｍＬ加え、2.0×10^5細胞／ｍＬに調製し、標的細胞溶液とした。

ｉｉ）エフェクター細胞溶液の調製

健常人静脈血５０ｍＬを採取し、ヘパリンナトリウム（武田薬品社製）０．５ｍＬを加え穏やかに混ぜた。これをＬｙｍｐｈｏｐｒｅｐ（Ｎｙｃｏｍｅｄ Ｐｈａｒｍａ ＡＳ社製）を用いて使用説明書に従い、遠心分離して単核球層を分離した。ＲＰＭＩ１６４０－ＦＢＳ（１０）培地で3回遠心分離して洗浄後、培地を用いて2.5×10^6細胞／ｍＬの濃度で再懸濁し、エフェクター細胞溶液とした。

ｉｉｉ）ＡＤＣＣ活性の測定

９６ウェルＵ字底プレート（Ｆａｌｃｏｎ社製）の各ウェルに上記ｉ）で調製した標的細胞溶液の５０μＬ（1×10^4細胞／ウェル）を分注した。次いでｉｉ）で調製したエフェクター細胞溶液を１００μＬ（2.5×10^5細胞／ウェル、エフェクター細胞と標的細胞の比は２５：１となる）添加した。更に、各種抗ＣＣＲ４キメラ抗体を最終濃度０．００２５～２．５μｇ／ｍＬとなるように加え、３７℃で４時間反応させた。反応後、プレートを遠心分離し、上清の^{51}Cr量をγ－カウンターにて測定した。自然解離^{51}Cr量は、エフェクター細胞溶液、抗体溶液の代わりに培地のみを用いて上記と同様の操作を行い、上清の^{51}Cr量を測定することにより求めた。全解離^{51}Cr量は、抗体溶液の代わりに培地のみを、エフェクター細胞溶液の代わりに１ｍｏｌ／Ｌの塩酸溶液を添加し、上記と同様の操作を行い、上清の^{51}Cr量を測定することにより求めた。ＡＤＣＣ活性は前記式（１）により求めた。

ＡＤＣＣ活性測定の結果を第２７図に示した。第２７図に示したように、ＧＭＤを発現させたＣＨＯ／ＣＣＲ４－ＬＣＡ株より取得した精製抗ＣＣＲ４キメラ抗体のＡＤＣＣ活性は、実施例４で取得した通常のＣＨＯ細胞由来の生産株が生産したＫＭ３０６０と同程度にまで低下していた。一方、ｐＡＧＥ２４９ベクターを導入したＣＨＯ／ＣＣＲ４－ＬＣＡ株より取得した精製抗ＣＣＲ４キメラ抗体のＡＤＣＣ活性は、ＣＨＯ／ＣＣＲ４－ＬＣＡ株より取得した精製抗ＣＣＲ４キメラ抗体と同程度のＡＤＣＣ活性を有していた。以上の結果より、ＣＨＯ／ＣＣＲ４－ＬＣＡ株はＧＭＤ遺伝子の発現量が低下しており、その結果ＡＤＣＣ活性の高い抗体を生産出来ることが示唆された。

（６）ＧＭＤを発現させたＣＨＯ／ＣＣＲ４－ＬＣＡ株由来の抗ＣＣＲ４キメラ抗体の糖鎖分析

実施例８の２項（３）で得られた精製抗ＣＣＲ４キメラ抗体の糖鎖分析を実施例３の１項に示す方法に従って行ない、その解析結果を第２８図に示した。実施例７で作製したＣＨＯ／ＣＣＲ４－ＬＣＡ株より取得した精製抗ＣＣＲ４キメラ抗体と比較して、ＧＭＤ遺伝子を発現させたＣＨＯ／ＣＣＲ４－ＬＣＡ株より取得した精製抗ＣＣＲ４キメラ抗体では、還元末端のＮ－アセチルグルコサミンの６位にフコースの１位がα結合していない糖鎖の割合が９％に低下していた。以上より、ＣＨＯ／ＣＣＲ４－ＬＣＡ株にＧＭＤ遺伝子を発現させることによって、該細胞の生産する抗体の還元末端のＮ－アセチルグルコサミンの６位にフコースの１位がα結合していない糖鎖の割合が５－０３株の生産する抗体と同程度まで低下することが示された。

実施例９．抗線維芽細胞増殖因子－８ヒト型キメラ抗体の作製

１．抗線維芽細胞増殖因子－８ヒト型キメラ抗体の安定生産細胞の作製

参考例３に記載の抗線維芽細胞増殖因子－８（以下、ＦＧＦ－８と表記する）ヒト型キメラ抗体のタンデム型発現ベクターｐＫＡＮＴＥＸ１３３４を用いて抗ＦＧＦ－８ヒト型キメラ抗体（以下、抗ＦＧＦ－８キメラ抗体と表記する）の安定生産細胞を以下のようにして作製した。

（１）ラットミエローマＹＢ２／０細胞を用いた生産細胞の作製

抗ＦＧＦ－８キメラ抗体発現ベクターｐＫＡＮＴＥＸ１３３４の１０μｇを４×１０^{6}細胞のラットミエローマＹＢ２／０細胞（ＡＴＣＣ　ＣＲＬ１６６２）へエレクトロポレーション法［サイトテクノロジー（Ｃｙｔｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ），３，１３３（１９９０）］により導入後、４０ｍＬのＨｙｂｒｉｄｏｍａ－ＳＦＭ－ＦＢＳ（５）［ＦＢＳ（ＰＡＡラボラトリーズ社製）を５％含むＨｙｂｒｉｄｏｍａ－ＳＦＭ培地（インビトロジェン社製）］に懸濁し、９６ウェル培養用プレート（住友ベークライト社製）に２００μＬ／ウェルずつ分注した。５％CO_2インキュベーター内で３７℃、２４時間培養した後、Ｇ４１８を０．５ｍｇ／ｍＬになるように添加して１～２週間培養した。Ｇ４１８耐性を示す形質転換株のコロニーが出現し、増殖の認められたウェルより培養上清を回収し、上清中の抗ＦＧＦ－８キメラ抗体の抗原結合活性を実施例９の２項記載のＥＬＩＳＡ法により測定した。

培養上清中に抗ＦＧＦ－８キメラ抗体の生産が認められたウェルの形質転換株については、ｄｈｆｒ遺伝子増幅系を利用して抗体生産量を増加させる目的で、Ｇ４１８を０．５ｍｇ／ｍＬ、ＤＨＦＲの阻害剤であるＭＴＸ（ＳＩＧＭＡ社製）を５０ｎｍｏｌ／Ｌ含むＨｙｂｒｉｄｏｍａ－ＳＦＭ－ＦＢＳ（５）培地に１～２×１０^{5}細胞／ｍＬになるように懸濁し、２４ウェルプレート（Ｇｒｅｉｎｅｒ社製）に１ｍＬずつ分注した。５％CO_2インキュベーター内で３７℃で１～２週間培養して、５０ｎｍｏｌ／Ｌ　ＭＴＸ耐性を示す形質転換株を誘導した。形質転換株の増殖が認められたウェルの培養上清中の抗ＦＧＦ－８キメラ抗体の抗原結合活性を実施例９の２項記載のＥＬＩＳＡ法により測定した。

培養上清中に抗ＦＧＦ－８キメラ抗体の生産が認められたウェルの形質転換株については、上記と同様の方法により、ＭＴＸ濃度を上昇させ、最終的にＧ４１８を０．５ｍｇ／ｍＬ、ＭＴＸを２００ｎｍｏｌ／Ｌの濃度で含むＨｙｂｒｉｄｏｍａ－ＳＦＭ－ＦＢＳ（５）培地で増殖可能かつ、抗ＦＧＦ－８キメラ抗体を高生産する形質転換株５－Ｄを得た。

得られた形質転換株について、限界希釈法によるクローン化を行い、得られた形質転換細

胞クローンを５－Ｄ－１０と名付けた。
（２）ＣＨＯ／ＤＧ４４細胞を用いた生産細胞の作製
実施例４に記載した方法に従い、抗ＦＧＦ－８キメラ抗体発現プラスミドｐＫＡＮＴＥＸ１３３４をＣＨＯ／ＤＧ４４細胞に導入し、薬剤ＭＴＸによる遺伝子増幅を行い、抗ＦＧＦ－８キメラ抗体を高生産する形質転換株を得た。抗体発現量の測定は実施例９の２項に記載したＥＬＩＳＡ法を用いて行いった。得られた形質転換株について、２回の限界希釈法によるクローン化を行い、得られた形質転換細胞クローンを７－Ｄ－１－５と名付けた。
２．抗体のＦＧＦ－８部分ペプチドに対する結合活性（ＥＬＩＳＡ法）
抗ＦＧＦ－８キメラ抗体が反応し得るヒトＦＧＦ－８ペプチドとして化合物２（配列番号２１）を選択した。ＥＬＩＳＡ法による活性測定に用いるため、以下の方法でＢＳＡ（ナカライテスク社製）とのコンジュゲートを作製し、抗原として用いた。すなわち、１０ｍｇのＢＳＡを含むＰＢＳ溶液９００ｍＬに、１００ｍＬの２５ｍｇ／ｍＬ　ＳＭＣＣ［４－（Ｎ－マレイミドメチル）シクロヘキサン－１－カルボキシリックアシッドＮ－ヒドロキシサクシンイミドエステル］（シグマ社製）－ＤＭＳＯ溶液を攪拌しながら滴下し、３０分間ゆっくりと攪拌した。２５ｍＬのＰＢＳで平衡化したＮＡＰ－１０カラムなどのゲルろ過カラムに反応液１ｍＬをアプライし、１．５ｍＬのＰＢＳで溶出させた溶出液をＢＳＡ－ＳＭＣＣ溶液とした（A_{280}測定からＢＳＡ濃度を算出）。次に、０．５ｍｇの化合物２に２５０ｍＬ　ＰＢＳを加え、次いで２５０ｍＬ　ＤＭＦを加えて完全に溶解させた後、前述のＢＳＡ－ＳＭＣＣ溶液（ＢＳＡ換算１．２５ｍｇ）を攪拌下で添加して３時間ゆっくり攪拌した。反応液をＰＢＳに対して４℃、一晩透析し、最終濃度０．０５％となるようにアジ化ナトリウムを添加して、０．２２μｍフィルターでろ過した後ＢＳＡ－化合物２溶液とした。
９６ウェルのＥＬＩＳＡ用プレート（グライナー社製）に、上述のように調製したコンジュゲートを１μｇ／ｍＬ、５０μＬ／ウェルで分注し、４℃で一晩放置して吸着させた。ＰＢＳで洗浄後、１％ＢＳＡ－ＰＢＳを１００μＬ／ウェルで加え、室温で１時間反応させて残存する活性基をブロックした。各ウェルをＴｗｅｅｎ－ＰＢＳで洗浄後、形質転換株の培養上清あるいは精製抗体を５０μＬ／ウェルで加え、室温で１時間反応させた。反応後、各ウェルをＴｗｅｅｎ－ＰＢＳで洗浄後、１％ＢＳＡ－ＰＢＳで３０００倍に希釈したペルオキシダーゼ標識ヤギ抗ヒトＩｇＧ（γ）抗体溶液（Ａｍｅｒｉｃａｎ　Ｑｕａｌｅｘ社製）を二次抗体溶液として、５０μＬ／ウェルで加え、室温で１時間反応させた。反応後、Ｔｗｅｅｎ－ＰＢＳで洗浄後、ＡＢＴＳ基質液を５０μＬ／ウェルで加えて発色させ、１０分後に５％ＳＤＳ溶液を５０μＬ／ウェル加えて反応を停止した。その後ＯＤ４１５を測定した。
３．抗ＦＧＦ－８キメラ抗体の精製
（１）ＹＢ２／０細胞由来の生産細胞の培養および抗体の精製
実施例９の１項（１）で得られた抗ＦＧＦ－８キメラ抗体を発現する形質転換株５－Ｄを２００ｎｍｏｌ／Ｌ　ＭＴＸ、Ｄａｉｇｏ’ｓ　ＧＦ２１（和光純薬製）を５％の濃度で含むＨｙｂｒｉｄｏｍａ－ＳＦＭ（インビトロジェン社製）培地中で、１８２ｃｍ^{2}フラスコ（Ｇｒｅｉｎｅｒ社製）にて５％CO_2インキュベーター内で３７℃にて培養した。８－１０日間培養して回収した培養上清より、Ｐｒｏｓｅｐ－Ａ（ミリポア社製）カラムを用いて、添付の説明書に従い、抗ＦＧＦ－８キメラ抗体を精製した。精製した抗ＦＧＦ－８キメラ抗体をＹＢ２／０－ＦＧＦ８キメラ抗体と名付けた。
（２）ＣＨＯ／ＤＧ４４細胞由来の生産細胞の培養および抗体の精製
実施例９の１項（２）で得られた抗ＦＧＦ－８キメラ抗体を生産する形質転換細胞クローン７－Ｄ－１－５をＩＭＤＭ－ｄＦＢＳ（１０）培地中で、１８２ｃｍ^{2}フラスコ（Ｇｒｅｉｎｅｒ社製）にて５％CO_2インキュベーター内で３７℃にて培養した。数日後、細胞密度がコンフルエントに達した時点で培養上清を除去し、２５ｍＬのＰＢＳバッファーにて細胞を洗浄後、ＥＸＣＥＬＬ３０１培地（ＪＲＨ社製）を３５ｍＬ注入した。５％CO_2インキュベーター内で３７℃にて７日間培養後、培養上清を回収した。培養上清より

Ｐｒｏｓｅｐ－Ａ（ミリポア社製）カラムを用いて、添付の説明書に従い、抗ＦＧＦ－８キメラ抗体を精製した。精製した抗ＦＧＦ－８キメラ抗体はＣＨＯ－ＦＧＦ８キメラ抗体と名付けた。

ＹＢ２／０－ＦＧＦ８キメラ抗体およびＣＨＯ－ＦＧＦ８キメラ抗体のＦＧＦ－８に対する結合活性を実施例９の２項に記載のＥＬＩＳＡ法により測定した結果、同等の結合活性を示した。

４．精製した抗ＦＧＦ－８キメラ抗体の解析

実施例９の３項で得られた各種動物細胞で生産、精製した２種類の抗ＦＧＦ－８キメラ抗体の各４μｇを公知の方法［ネイチャー（Ｎａｔｕｒｅ），２２７，６８０（１９７０）］に従ってＳＤＳ－ＰＡＧＥし、分子量および製精度を解析した。精製した各抗ＦＧＦ－８キメラ抗体は、いずれも非還元条件下では分子量が約１５０Ｋｄの単一のバンドが、還元条件下では約５０Ｋｄと約２５Ｋｄの２本のバンドが認められた。これらの分子量は、抗体のＨ鎖およびＬ鎖のｃＤＮＡの塩基配列から推定される分子量（Ｈ鎖：約４９Ｋｄ、Ｌ鎖：約２３Ｋｄ、分子全体：約１４４Ｋｄ）とほぼ一致し、更に、ＩｇＧ型の抗体は、非還元条件下では分子量は約１５０Ｋｄであり、還元条件下では分子内のＳ－Ｓ結合が切断され、約５０Ｋｄの分子量を持つＨ鎖と約２５Ｋｄの分子量を持つＬ鎖に分解されるという報告（アンティボディズ，Ｃｈａｐｔｅｒ　１４、モノクローナル・アンティボディズ）と一致し、抗ＦＧＦ－８キメラ抗体が正しい構造の抗体分子として発現され、かつ精製されたことが確認された。

５．精製した抗ＦＧＦ－８キメラ抗体の糖鎖分析

実施例９の４項で調製したＹＢ２／０細胞由来の抗ＦＧＦ－８キメラ抗体であるＹＢ２／０－ＦＧＦ８キメラ抗体とＣＨＯ／ＤＧ４４細胞由来の抗ＦＧＦ－８キメラ抗体であるＣＨＯ－ＦＧＦ８キメラ抗体の糖鎖分析を、実施例３の１項に記載の方法に従って行なった。その結果、還元末端のＮ－アセチルグルコサミンの６位にフコースの１位がα結合していない糖鎖の割合は、ＹＢ２／０－ＦＧＦ８キメラ抗体は５８％、ＣＨＯ－ＦＧＦ８キメラ抗体は１３％であった。以下、これらの試料を、抗ＦＧＦ－８キメラ抗体（５８％）、抗ＦＧＦ－８キメラ抗体（１３％）と表記する。

実施例１０．可溶性ヒトＦｃγＲＩＩＩａ蛋白質の作製

１．可溶性ヒトＦｃγＲＩＩＩａ蛋白質の発現ベクターの構築

（１）ヒト末梢血単核球ｃＤＮＡの作製

健常人の静脈血３０ｍＬを採取し、ヘパリンナトリウム（清水製薬社製）０．５ｍＬを加えて穏やかに混和した後、生理的食塩水（大塚製薬社製）３０ｍＬと混合した。混合後、各１０ｍＬをそれぞれＬｙｍｐｈｏｐｒｅｐ（ＮＹＣＯＭＥＤ　ＰＨＡＲＭＡ　ＡＳ社製）４ｍＬ上に穏やかに重層し、室温下２０００ｒｐｍで３０分間の遠心分離を行った。分離された単核球画分を各遠心管より集めて混合し、ＲＰＭＩ１６４０－ＦＢＳ（１０）３０ｍＬに懸濁した。室温下１２００ｒｐｍで１５分間の遠心分離を行った後、上清を除去し、該細胞をＲＰＭＩ１６４０－ＦＢＳ（１０）２０ｍＬに懸濁した。この洗浄操作を２回繰り返した後、ＲＰＭＩ１６４０－ＦＢＳ（１０）を用いて2×10^{6}個／ｍＬの末梢血単核球懸濁液を調製した。

上記のようにして調製した末梢血単核球懸濁液の５ｍＬを室温下８００ｒｐｍで５分間の遠心分離を行った後、上清を除去し、５ｍＬのＰＢＳに懸濁した。室温下８００ｒｐｍで５分間の遠心分離を行った後、上清を除去し、ＱＩＡａｍｐ　ＲＮＡ　Ｂｌｏｏｄ　Ｍｉｎｉ　Ｋｉｔ（ＱＩＡＧＥＮ社製）を用いて添付の説明書に従い、全ＲＮＡを抽出した。得られた全ＲＮＡ２μｇに対し、ＳＵＰＥＲＳＣＲＩＰＴ^{TM}　Ｐｒｅａｍｐｌｉｆｉｃａｔｉｏｎ　Ｓｙｓｔｅｍ　ｆｏｒ　Ｆｉｒｓｔ　Ｓｔｒａｎｄ　ｃＤＮＡ　Ｓｙｎｔｈｅｓｉｓ（Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ社製）を用いて添付の説明書に従い、オリゴ（ｄＴ）をプライマーとした４０μＬの系で逆転写反応を行うことにより、一本鎖ｃＤＮＡを合成した。

（２）ヒトＦｃγＲＩＩＩａ蛋白質をコードするｃＤＮＡの取得

ヒトＦｃγＲＩＩＩａ蛋白質（以下、ｈＦｃγＲＩＩＩａと表記する）のｃＤＮＡの取得

は、以下のようにして行った。
まず、ｈＦｃγＲＩＩＩａのｃＤＮＡの塩基配列［ジャーナル・オブ・エクスペリメンタル・メディスン（Ｊ．Ｅｘｐ．Ｍｅｄ．），１７０，４８１（１９８９）］より、翻訳開始コドンを含む特異的なフォワードプライマー（配列番号２２に示す）および翻訳終止コドンを含む特異的なリバースプライマー（配列番号２６に示す）を設計した。
次にＤＮＡポリメラーゼＥｘＴａｑ（宝酒造社製）を用いて、実施例１０の１項（１）で調製したヒト末梢血単核球由来のｃＤＮＡ溶液の２０倍希釈液５μＬを含む５０μＬの反応液［１倍濃度のＥｘＴａｑ　ｂｕｆｆｅｒ（宝酒造社製）、０．２ｍｍｏｌ／Ｌ　ｄＮＴＰｓ、１μｍｏｌ／Ｌ　上記遺伝子特異的プライマー（配列番号２２および２６）］を調製し、ＰＣＲを行った。ＰＣＲは、９４℃で３０秒間、５６℃で３０秒間、７２℃で６０秒間からなる反応を１サイクルとして、３５サイクル行った。
ＰＣＲ後、反応液をＱＩＡｑｕｉｃｋ　ＰＣＲ　Ｐｕｒｉｆｉｃａｔｉｏｎ　Ｋｉｔ（ＱＩＡＧＥＮ社製）を用いて精製し、滅菌水２０μＬに溶解した。制限酵素ＥｃｏＲＩ（宝酒造社製）およびＢａｍＨＩ（宝酒造社製）で消化後、０．８％アガロースゲル電気泳動に供し、特異的増幅断片約８００ｂｐを回収した。
一方、プラスミドｐＢｌｕｅｓｃｒｉｐｔＩＩ　ＳＫ（－）２．５μｇ（Ｓｔｒａｔａｇｅｎｅ社製）を制限酵素ＥｃｏＲＩ（宝酒造社製）およびＢａｍＨＩ（宝酒造社製）で消化後、０．８％アガロースゲル電気泳動に供し、約２．９ｋｂｐの断片を回収した。
上記で得たヒト末梢血単核球ｃＤＮＡ由来増幅断片とプラスミドｐＢｌｕｅｓｃｒｉｐｔＩＩＳＫ（－）由来の断片を、ＤＮＡ　Ｌｉｇａｔｉｏｎ　Ｋｉｔ　Ｖｅｒ．２．０（宝酒造社製）を用いて連結反応を行った。該反応液を用いて大腸菌ＤＨ５α株（東洋紡績社製）を形質転換し、得られたアンピシリン耐性コロニーより公知の方法に従って各々プラスミドＤＮＡを単離した。
各プラスミドに挿入されたｃＤＮＡの塩基配列は、ＤＮＡシークエンサー３７７（Ｐａｒｋｉｎ　Ｅｌｍｅｒ社製）およびＢｉｇＤｙｅ　Ｔｅｒｍｉｎａｔｏｒ　Ｃｙｃｌｅ　Ｓｅｑｕｅｎｃｉｎｇ　ＦＳ　Ｒｅａｄｙ　Ｒｅａｃｔｉｏｎ　Ｋｉｔ（Ｐａｒｋｉｎ　Ｅｌｍｅｒ社製）を添付マニュアルに従い使用して決定した。本法により配列決定した全ての挿入ｃＤＮＡが、ｈＦｃγＲＩＩＩａのｃＤＮＡのＯＲＦ全長配列をコードすることを確認した。このうちＰＣＲに伴う塩基の読み誤りを該配列内に全く含まないプラスミドＤＮＡを選択した。以下、本プラスミドをｐＢＳＦｃγＲＩＩＩａ５－３と称す。
決定したｈＦｃγＲＩＩＩａの全長ｃＤＮＡ配列を配列番号２７、それに対応するアミノ酸配列を配列番号２８に示す。
（３）可溶性ｈＦｃγＲＩＩＩａをコードするｃＤＮＡの取得
ｈＦｃγＲＩＩＩａの細胞外領域（配列番号２８の１～１９３番目）とＣ末端にＨｉｓ－ｔａｇ配列を持つ可溶性ｈＦｃγＲＩＩＩａ（以下、ｓｈＦｃγＲＩＩＩａ）をコードするｃＤＮＡは、以下のようにして構築した。
まず、ｈＦｃγＲＩＩＩａのｃＤＮＡの塩基配列（配列番号２７）より、細胞外領域に特異的なプライマーＦｃｇＲ３－１（配列番号２９に示す）を設計した。
次にＤＮＡポリメラーゼＥｘＴａｑ（宝酒造社製）を用いて、実施例１０の１項（２）で作製したプラスミドｐＢＳＦｃγＲＩＩＩａ５－３を５ｎｇを含む５０μＬの反応液［１倍濃度のＥｘＴａｑ　ｂｕｆｆｅｒ（宝酒造社製）、０．２ｍｍｏｌ／Ｌ　ｄＮＴＰｓ、１μｍｏｌ／Ｌ　プライマーＦｃｇＲ３－１、１μｍｏｌ／ＬプライマーＭ１３Ｍ４（宝酒造社製）］を調製し、ＰＣＲを行った。ＰＣＲは、９４℃で３０秒間、５６℃で３０秒間、７２℃で６０秒間からなる反応を１サイクルとして、３５サイクル行った。
ＰＣＲ後、反応液をＱＩＡｑｕｉｃｋ　ＰＣＲ　Ｐｕｒｉｆｉｃａｔｉｏｎ　Ｋｉｔ（ＱＩＡＧＥＮ社製）を用いて精製し、滅菌水２０μＬに溶解した。制限酵素ＰｓｔＩ（宝酒造社製）およびＢａｍＨＩ（宝酒造社製）で消化後、０．８％アガロースゲル電気泳動に供し、特異的増幅断片約１１０ｂｐを回収した。
一方、プラスミドｐＢＳＦｃγＲＩＩＩａ５－３　２．５μｇを制限酵素ＰｓｔＩ（宝酒造社製）およびＢａｍＨＩ（宝酒造社製）で消化後、０．８％アガロースゲル電気泳動に

供し、約３．５ｋｂｐの断片を回収した。
上記で得たｈＦｃγＲＩＩＩａ ｃＤＮＡ由来増幅断片とプラスミドｐＢＳＦｃγＲＩＩＩａ５－３由来の断片を、ＤＮＡ Ｌｉｇａｔｉｏｎ Ｋｉｔ Ｖｅｒ．２．０（宝酒造社製）を用いて連結反応を行った。該反応液を用いて大腸菌ＤＨ５α株（東洋紡績社製）を形質転換し、得られたアンピシリン耐性コロニーより公知の方法に従って各々プラスミドＤＮＡを単離した。
各プラスミドに挿入されたｃＤＮＡの塩基配列は、ＤＮＡシークエンサー３７７（Ｐａｒｋｉｎ Ｅｌｍｅｒ社製）およびＢｉｇＤｙｅ Ｔｅｒｍｉｎａｔｏｒ Ｃｙｃｌｅ Ｓｅｑｕｅｎｃｉｎｇ ＦＳ Ｒｅａｄｙ Ｒｅａｃｔｉｏｎ Ｋｉｔ（Ｐａｒｋｉｎ Ｅｌｍｅｒ社製）を添付マニュアルに従い使用して決定した。本法により配列決定した全ての挿入ｃＤＮＡが、目的のｓｈＦｃγＲＩＩＩａのｃＤＮＡのＯＲＦ全長配列をコードすることを確認した。このうちＰＣＲに伴う塩基の読み誤りを該配列内に全く含まないプラスミドＤＮＡを選択した。以下、本プラスミドをｐＢＳＦｃγＲＩＩＩａ＋Ｈｉｓ３と称す。
決定したｓｈＦｃγＲＩＩＩａの全長ｃＤＮＡ配列を配列番号３０、それに対応するアミノ酸配列を配列番号３１に示す。
（４）ｓｈＦｃγＲＩＩＩａの発現ベクターの構築
ｓｈＦｃγＲＩＩＩａの発現ベクターは、以下のようにして構築した。
実施例１０の１項（３）で得られたプラスミドｐＢＳＦｃγＲＩＩＩａ＋Ｈｉｓ３ ３．０μｇを制限酵素ＥｃｏＲＩ（宝酒造社製）およびＢａｍＨＩ（宝酒造社製）で消化後、０．８％アガロースゲル電気泳動に供し、約６２０ｂｐの断片を回収した。
一方、ＷＯ９７／１０３５４に記載のプラスミドｐＫＡＮＴＥＸ９３ ２．０μｇを制限酵素ＥｃｏＲＩ（宝酒造社製）およびＢａｍＨＩ（宝酒造社製）で消化後、０．８％アガロースゲル電気泳動に供し、約１０．７ｋｂｐの断片を回収した。
上記で得たｓｈＦｃγＲＩＩＩａ ｃＤＮＡを含むＤＮＡ断片とプラスミドｐＫＡＮＴＥＸ９３由来の断片を、ＤＮＡ Ｌｉｇａｔｉｏｎ Ｋｉｔ Ｖｅｒ．２．０（宝酒造社製）を用いて連結反応を行った。該反応液を用いて大腸菌ＤＨ５α株（東洋紡績社製）を形質転換し、得られたアンピシリン耐性コロニーより公知の方法に従って各々プラスミドＤＮＡを単離した。
各プラスミドに挿入されたｃＤＮＡの塩基配列は、ＤＮＡシークエンサー３７７（Ｐａｒｋｉｎ Ｅｌｍｅｒ社製）およびＢｉｇＤｙｅ Ｔｅｒｍｉｎａｔｏｒ Ｃｙｃｌｅ Ｓｅｑｕｅｎｃｉｎｇ ＦＳ ＲｅａｄｙＲｅａｃｔｉｏｎ Ｋｉｔ（Ｐａｒｋｉｎ Ｅｌｍｅｒ社製）を添付マニュアルに従い使用して決定した。本法により配列決定した全てのプラスミドが、目的のｓｈＦｃγＲＩＩＩａのｃＤＮＡを含むことを確認した。得られた発現ベクターを以下、ｐＫＡＮＴＥＸＦｃγＲＩＩＩａ－Ｈｉｓと称す。
２．ｓｈＦｃγＲＩＩＩａの安定生産細胞の作製
実施例１０の１項で構築したｓｈＦｃγＩＩＩａの発現ベクターｐＫＡＮＴＥＸＦｃγＲＩＩＩａ－Ｈｉｓをラットミエローマ ＹＢ２／０細胞［ＡＴＣＣ ＣＲＬ－１６６２、ジャーナル・オブ・セルラー・バイオロジー（Ｊ．Ｃｅｌｌ．Ｂｉｏｌ．），９３，５７６（１９８２）］に導入し、ｓｈＦｃγＲＩＩＩａの安定生産細胞を以下のようにして作製した。
制限酵素ＡａｔＩＩで消化し、線状化したｐＫＡＮＴＥＸＦｃγＲＩＩＩａ－Ｈｉｓの１０μｇを４×１０^{6}細胞のヘエレクトロポレーション法［サイトテクノロジー（Ｃｙｔｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ），３，１３３（１９９０）］により導入後、４０ｍＬのＨｙｂｒｉｄｏｍａ－ＳＦＭ－ＦＢＳ（１０）［１０％ＦＢＳを含むＨｙｂｒｉｄｏｍａ－ＳＦＭ培地（Ｌｉｆｅ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅ社製）］に懸濁し、９６ウェル培養用プレート（住友ベークライト社製）に２００μＬ／ウェルずつ分注した。５％CO_2インキュベーター内で３７℃、２４時間培養した後、Ｇ４１８を１．０ｍｇ／ｍＬになるように添加して１～２週間培養した。Ｇ４１８耐性を示す形質転換株のコロニーが出現し、増殖の認められたウェルより培養上清を回収し、上清中のｓｈＦｃγＲＩＩＩａの発現量を実施例１

０の３項に示すＥＬＩＳＡ法により測定した。
培養上清中にｓｈＦｃγＲＩＩＩａの発現が認められたウェルの形質転換株については、ｄｈｆｒ遺伝子増幅系を利用して抗体生産量を増加させる目的で、Ｇ４１８を１．０ｍｇ／ｍＬ、ＤＨＦＲの阻害剤であるＭＴＸ（ＳＩＧＭＡ社製）を５０ｎｍｏｌ／Ｌ含むＨｙｂｒｉｄｏｍａ－ＳＦＭ－ＦＢＳ（１０）培地に１～２×10^5細胞／ｍＬになるように懸濁し、２４ウェルプレート（Ｇｒｅｉｎｅｒ社製）に２ｍＬずつ分注した。５％CO_2インキュベーター内で３７℃で１～２週間培養して、５０ｎｍｏｌ／Ｌ　ＭＴＸ耐性を示す形質転換株を誘導した。形質転換株の増殖が認められたウェルの培養上清中のｓｈＦｃγＲＩＩＩａの発現量を実施例１０の３項に示すＥＬＩＳＡ法により測定した。培養上清中にｓｈＦｃγＲＩＩＩａの発現が認められたウェルの形質転換株については、上記と同様の方法により、ＭＴＸ濃度を１００ｎｍｏｌ／Ｌ、２００ｎｍｏｌ／Ｌと順次上昇させ、最終的にＧ４１８を１．０ｍｇ／ｍＬ、ＭＴＸを２００ｎｍｏｌ／Ｌの濃度で含むＨｙｂｒｉｄｏｍａ－ＳＦＭ－ＦＢＳ（１０）培地で増殖可能かつ、ｓｈＦｃγＲＩＩＩａを高生産する形質転換株を得た。得られた形質転換株に対して、２回の限界希釈法によるクローン化を行った。このようにして得られた形質転換株をＫＣ１１０７株と名付けた。
３．ｓｈＦｃγＲＩＩＩａの検出（ＥＬＩＳＡ法）
培養上清中あるいは精製したｓｈＦｃγＲＩＩＩａの検出、定量は、以下に示すＥＬＩＳＡ法により行った。
Ｈｉｓ－ｔａｇに対するマウス抗体Ｔｅｔｒａ・Ｈｉｓ　Ａｎｔｉｂｏｄｙ（ＱＩＡＧＥＮ社製）をＰＢＳを用いて５μｇ／ｍＬに調製した溶液を９６ウェルのＥＬＩＳＡ用のプレート（Ｇｒｅｉｎｅｒ社製）に５０μＬ／ウェルで分注し、４℃、１２時間以上反応させた。反応後、１％ＢＳＡ－ＰＢＳを１００μＬ／ウェルで加え、室温で１時間反応させて残存する活性基をブロックした。１％ＢＳＡ－ＰＢＳを捨て、形質転換株の培養上清あるいは精製したｓｈＦｃγＲＩＩＩａの各種希釈溶液を５０μＬ／ウェルで加え、室温で１時間反応させた。反応後、各ウェルをＴｗｅｅｎ－ＰＢＳで洗浄後、１％ＢＳＡ－ＰＢＳで５０倍に希釈したビオチン標識マウス抗ヒトＣＤ１６抗体溶液（ＰｈａｒＭｉｎｇｅｎ社製）を５０μＬ／ウェルで加え、室温で１時間反応させた。反応後、Ｔｗｅｅｎ－ＰＢＳで洗浄後、１％ＢＳＡ－ＰＢＳで４０００倍に希釈したペルオキシダーゼ標識Ａｖｉｄｉｎ　Ｄ溶液（Ｖｅｃｔｏｒ社製）を５０μＬ／ウェルで加え、室温で１時間反応させた。反応後、Ｔｗｅｅｎ－ＰＢＳで洗浄後、ＡＢＴＳ基質液を５０μＬ／ウェルで加えて発色させ、ＯＤ４１５を測定した。
４．ｓｈＦｃγＲＩＩＩａの精製
実施例１０の２項で得られたｓｈＦｃγＲＩＩＩａを生産する形質転換細胞クローンＫＣ１１０７をＧ４１８を１．０ｍｇ／ｍＬ、ＭＴＸを２００ｎｍｏｌ／Ｌで含むＨｙｂｒｉｄｏｍａ－ＳＦＭ－ＧＦ（５）［５％Ｄａｉｇｏ’ｓ　ＧＦ２１（和光純薬社製）を含むＨｙｂｒｉｄｏｍａ－ＳＦＭ培地（Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅ社製）］に３×10^5細胞／］ｍＬとなるように懸濁し、１８２cm^2フラスコ（Ｇｒｅｉｎｅｒ社製）に５０ｍＬ分注した。５％CO_2インキュベーター内で３７℃で４日間培養後、培養上清を回収した。培養上清よりＮｉ－ＮＴＡ　ａｇａｒｏｓｅ（ＱＩＡＧＥＮ社製）カラムを用いて、添付の説明書に従い、ｓｈＦｃγＲＩＩＩａを精製した。
５．精製したｓｈＦｃγＲＩＩＩａの解析
実施例１０の４項で得られた精製ｓｈＦｃγＲＩＩＩａの濃度は、以下のようにしてアミノ酸組成分析を行い、算出した。精製ｓｈＦｃγＲＩＩＩａの一部を６ｍｏｌ／Ｌ塩酸、１％フェノール溶液に懸濁し、１１０℃で２０時間、気相中で加水分解を行った。加水分解には、Ｗａｔｅｒｓ社製ワークステーションを使用した。加水分解後のアミノ酸をＢｉｄｌｉｎｇｍｅｙｅｒらの方法［ジャーナル・オブ・クロマトグラフィー（Ｊ．Ｃｈｒｏｍａｔｏｇｒ．），３３６，９３（１９８４）］に従い、ＰＴＣ－アミノ酸誘導体として、ＰｉｃｏＴａｇアミノ酸分析装置（Ｗａｔｅｒｓ社製）を用いて分析した。
次に、精製したｓｈＦｃγＲＩＩＩａの約０．５μｇを公知の方法［ネイチャー（Ｎａｔｕｒｅ），２２７，６８０，（１９７０）］に従って還元条件下でのＳＤＳ－ＰＡＧＥを

行い、分子量および精製度を解析した。その結果を第２９図に示した。第２９図に示したように、精製したｓｈＦｃγＲＩＩＩａは、分子量３６～３８Ｋｄのブロードなバンドが検出された。ｈＦｃγＲＩＩＩａの細胞外領域には、５箇所のＮ－グリコシド型の糖鎖結合可能部位が存在していることが知られており［ジャーナル・オブ・エクスペリメンタル・メディスン（Ｊ．Ｅｘｐ．Ｍｅｄ．），１７０，４８１（１９８９）］、精製したｓｈＦｃγＲＩＩＩａのブロードな分子量の分布は、糖鎖付加の不均一性に起因すると考えられた。一方、精製したｓｈＦｃγＲＩＩＩａのＮ末端アミノ酸配列をプロテインシーケンサーＰＰＳＱ－１０（島津製作所製）を用いて自動エドマン分解により解析した結果、ｓｈＦｃγＲＩＩＩａのｃＤＮＡより予想される配列が得られたことより、目的のｓｈＦｃγＲＩＩＩａが精製できたことが確認された。

実施例１１．各種キメラ抗体のｓｈＦｃγＲＩＩＩａに対する結合活性の評価

１．還元末端のＮ－アセチルグルコサミンの６位にフコースの１位がα結合していない糖鎖の割合の異なる抗ＧＤ３キメラ抗体のｓｈＦｃγＲＩＩＩａに対する結合活性の評価

実施例３の１項に記載の還元末端のＮ－アセチルグルコサミンの６位にフコースの１位がα結合していない糖鎖の割合の異なる２種類の抗ＧＤ３キメラ抗体である抗ＧＤ３キメラ抗体（４５％）と抗ＧＤ３キメラ抗体（７％）のｓｈＦｃγＲＩＩＩａに対する結合活性は、以下のようにしてＥＬＩＳＡ法を用いて測定した。

実施例１の３項に記載の方法に従い、９６ウェルのＥＬＩＳＡ用プレート（グライナー社製）に、１００ｐｍｏｌ／ｗｅｌｌでＧＤ３を固定化した。１％ＢＳＡ－ＰＢＳを１００μＬ／ウェルで加え、室温で１時間反応させて残存する活性基をブロックした。各ウェルをＴｗｅｅｎ－ＰＢＳで洗浄後、各種抗ＧＤ３キメラ抗体の１％ＢＳＡ－ＰＢＳによる希釈溶液を５０μＬ／ウェルで加え、室温で１時間反応させた。反応後、各ウェルをＴｗｅｅｎ－ＰＢＳで洗浄後、１％ＢＳＡ－ＰＢＳで２．３μｇ／ｍＬに希釈したｓｈＦｃγＲＩＩＩａ溶液を５０μＬ／ウェルで加え、室温で１時間反応させた。反応後、Ｔｗｅｅｎ－ＰＢＳで洗浄後、Ｈｉｓ－ｔａｇに対するマウス抗体Ｔｅｔｒａ・Ｈｉｓ Ａｎｔｉｂｏｄｙ（ＱＩＡＧＥＮ社製）を１％ＢＳＡ－ＰＢＳを用いて１μｇ／ｍＬに調製した溶液を５０μＬ／ウェルで加え、室温で１時間反応させた。反応後、Ｔｗｅｅｎ－ＰＢＳで洗浄後、１％ＢＳＡ－ＰＢＳで２００倍に希釈したペルオキシダーゼ標識ヤギ抗マウスＩｇＧ１抗体溶液（ＺＹＭＥＤ社製）を５０μＬ／ウェルで加え、室温で１時間反応させた。反応後、Ｔｗｅｅｎ－ＰＢＳで洗浄後、ＡＢＴＳ基質液を５０μＬ／ウェルで加えて発色させ、ＯＤ４１５を測定した。また、別のプレートに各種抗ＧＤ３キメラ抗体を添加し、実施例１の３項に記載のＥＬＩＳＡ法を行うことにより、プレートに結合した各種抗ＧＤ３キメラ抗体量に差がないことを確認した。第３０図に、各種抗ＧＤ３キメラ抗体のｓｈＦｃγＲＩＩＩａに対する結合活性を測定した結果を示した。第３０図に示したように、抗ＧＤ３キメラ抗体のｓｈＦｃγＲＩＩＩａに対する結合活性は、還元末端のＮ－アセチルグルコサミンの６位にフコースの１位がα結合していない糖鎖の割合の高い抗ＧＤ３キメラ抗体（４５％）の方が１０倍以上高かった。

２．還元末端のＮ－アセチルグルコサミンの６位にフコースの１位がα結合していない糖鎖の割合の異なる抗ＦＧＦ－８キメラ抗体のｓｈＦｃγＲＩＩＩａに対する結合活性の評価

実施例９の５項に記載の還元末端のＮ－アセチルグルコサミンの６位にフコースの１位がα結合していない糖鎖の割合の異なる２種類の抗ＦＧＦ－８キメラ抗体である抗ＦＧＦ－８キメラ抗体（５８％）と抗ＦＧＦ－８キメラ抗体（１３％）のｓｈＦｃγＲＩＩＩａに対する結合活性は、以下のようにしてＥＬＩＳＡ法を用いて測定した。

実施例９の２項で調製したヒトＦＧＦ－８ペプチドコンジュゲートを９６ウェルのＥＬＩＳＡ用プレート（グライナー社製）に、１．０μｇ／ｍＬで５０μＬ／ウェルで分注し、４℃で一晩放置して吸着させた。ＰＢＳで洗浄後、１％ＢＳＡ－ＰＢＳを１００μＬ／ウェルで加え、室温で１時間反応させて残存する活性基をブロックした。各ウェルをＴｗｅｅｎ－ＰＢＳで洗浄後、各種抗ＦＧＦ－８キメラ抗体の１％ＢＳＡ－ＰＢＳによる希釈溶液を５０μＬ／ウェルで加え、室温で１時間反応させた。反応後、各ウェルをＴｗｅｅｎ

－ＰＢＳで洗浄後、１％ＢＳＡ－ＰＢＳで３．０μｇ／ｍＬに希釈したｓｈＦｃγＲＩＩＩａ溶液を５０μＬ／ウェルで加え、室温で１時間反応させた。反応後、Ｔｗｅｅｎ－ＰＢＳで洗浄後、Ｈｉｓ－ｔａｇに対するマウス抗体Ｔｅｔｒａ・Ｈｉｓ　Ａｎｔｉｂｏｄｙ（ＱＩＡＧＥＮ社製）を１％ＢＳＡ－ＰＢＳを用いて１μｇ／ｍＬに調製した溶液を５０μＬ／ウェルで加え、室温で１時間反応させた。反応後、Ｔｗｅｅｎ－ＰＢＳで洗浄後、１％ＢＳＡ－ＰＢＳで２００倍に希釈したペルオキシダーゼ標識ヤギ抗マウスＩｇＧ１抗体溶液（ＺＹＭＥＤ社製）を５０μＬ／ウェルで加え、室温で１時間反応させた。反応後、Ｔｗｅｅｎ－ＰＢＳで洗浄後、ＡＢＴＳ基質液を５０μＬ／ウェルで加えて発色させ、ＯＤ４１５を測定した。また、別のプレートに各種抗ＦＧＦ－８キメラ抗体を添加し、実施例９の２項に記載のＥＬＩＳＡ法を行うことにより、プレートに結合した各種抗ＦＧＦ－８キメラ抗体量に差がないことを確認した。第３１図に、各種抗ＦＧＦ－８キメラ抗体のｓｈＦｃγＲＩＩＩａに対する結合活性を測定した結果を示した。第３１図に示したように、抗ＦＧＦ－８キメラ抗体のｓｈＦｃγＲＩＩＩａに対する結合活性は、還元末端のＮ－アセチルグルコサミンの６位にフコースの１位がα結合していない糖鎖の割合の高い抗ＦＧＦ－８キメラ抗体（５８％）の方が１００倍以上高かった。

３．還元末端のＮ－アセチルグルコサミンの６位にフコースの１位がα結合していない糖鎖の割合の異なる抗ＣＣＲ４キメラ抗体のｓｈＦｃγＲＩＩＩａに対する結合活性の評価

実施例４の５項で調製した還元末端のＮ－アセチルグルコサミンの６位にフコースの１位がα結合していない糖鎖の割合の異なる７種類の抗ＣＣＲ４キメラ抗体のｓｈＦｃγＲＩＩＩａに対する結合活性は、以下のようにしてＥＬＩＳＡ法を用いて測定した。

実施例４の２項で調製したヒトＣＣＲ４細胞外領域ペプチドコンジュゲートを９６ウェルのＥＬＩＳＡ用プレート（グライナー社製）に、１．０μｇ／ｍＬで５０μＬ／ウェルで分注し、４℃で一晩放置して吸着させた。ＰＢＳで洗浄後、１％ＢＳＡ－ＰＢＳを１００μＬ／ウェルで加え、室温で１時間反応させて残存する活性基をブロックした。各ウェルをＴｗｅｅｎ－ＰＢＳで洗浄後、各種抗ＣＣＲ４キメラ抗体の１％ＢＳＡ－ＰＢＳによる希釈溶液を５０μＬ／ウェルで加え、室温で１時間反応させた。反応後、各ウェルをＴｗｅｅｎ－ＰＢＳで洗浄後、１％ＢＳＡ－ＰＢＳで３．０μｇ／ｍＬに希釈したｓｈＦｃγＲＩＩＩａ溶液を５０μＬ／ウェルで加え、室温で１時間反応させた。反応後、Ｔｗｅｅｎ－ＰＢＳで洗浄後、Ｈｉｓ－ｔａｇに対するマウス抗体Ｔｅｔｒａ・Ｈｉｓ　Ａｎｔｉｂｏｄｙ（ＱＩＡＧＥＮ社製）を１％ＢＳＡ－ＰＢＳを用いて１μｇ／ｍＬに調製した溶液を５０μＬ／ウェルで加え、室温で１時間反応させた。反応後、Ｔｗｅｅｎ－ＰＢＳで洗浄後、１％ＢＳＡ－ＰＢＳで２００倍に希釈したペルオキシダーゼ標識ヤギ抗マウスＩｇＧ１抗体溶液（ＺＹＭＥＤ社製）を５０μＬ／ウェルで加え、室温で１時間反応させた。反応後、Ｔｗｅｅｎ－ＰＢＳで洗浄後、ＡＢＴＳ基質液を５０μＬ／ウェルで加えて発色させ、ＯＤ４１５を測定した。また、別のプレートに各種抗ＣＣＲ４キメラ抗体を添加し、実施例４の２項に記載のＥＬＩＳＡ法を行うことにより、プレートに結合した各種抗ＣＣＲ４キメラ抗体量に差がないことを確認した。第３２Ａ図に、各種抗ＣＣＲ４キメラ抗体のｓｈＦｃγＲＩＩＩａに対する結合活性を測定した結果を示した。第３２Ａ図に示したように、抗ＣＣＲ４キメラ抗体のｓｈＦｃγＲＩＩＩａに対する結合活性は、還元末端のＮ－アセチルグルコサミンの６位にフコースの１位がα結合していない糖鎖の割合に比例して上昇した。第３２Ｂ図に、抗体濃度が４μｇ／ｍＬおよび４０μｇ／ｍＬにおける還元末端のＮ－アセチルグルコサミンの６位にフコースの１位がα結合していない糖鎖の割合（横軸）とｓｈＦｃγＲＩＩＩａ結合活性（縦軸）との関係をプロットした図を示した。第３２Ｂ図に示したように、還元末端のＮ－アセチルグルコサミンの６位にフコースの１位がα結合していない糖鎖の割合が２０％未満の抗体である、抗ＣＣＲ４キメラ抗体（８％）、抗ＣＣＲ４キメラ抗体（９％）、抗ＣＣＲ４キメラ抗体（１８％）では、ｓｈＦｃγＲＩＩＩａ結合活性は、ほとんど検出されなかった。

以上の結果は、還元末端のＮ－アセチルグルコサミンの６位にフコースの１位がα結合していない糖鎖を持つ抗体は、α１，６－フコースを持つ糖鎖を持つ抗体よりも、高いＦｃγＲＩＩＩａ結合活性を有することを明確に示したものである。そして、実施例３および

４に示したように、還元末端のＮ－アセチルグルコサミンの６位にフコースの１位がα結合していない糖鎖を持つ抗体は、α１，６－フコースを持つ糖鎖を持つ抗体よりも高いＡＤＣＣ活性を示したことから、還元末端のＮ－アセチルグルコサミンの６位にフコースの１位がα結合していない糖鎖を持つ抗体の高いＡＤＣＣ活性は、高いＦｃγＲＩＩＩａ結合活性に起因することが強く示唆された。また、第３２Ｂ図に示すようにＦｃγＲＩＩＩａ結合活性と還元末端のＮ－アセチルグルコサミンの６位にフコースの１位がα結合していない糖鎖の割合との間には比例関係があるので、このような検量線を予め作成しておくことにより、ＦｃγＲＩＩＩａ結合活性を測定することにより抗体組成物の還元末端のＮ－アセチルグルコサミンの６位にフコースの１位がα結合していない糖鎖の割合を定量することができる。この方法により、抗体組成物の有する細胞障害活性の測定をすることなく、簡便に細胞障害活性の予測を行うことができる。

実施例１２．レクチン耐性ＣＨＯ／ＤＧ４４細胞が生産する抗体のｓｈＦｃγＲＩＩＩａに対する結合活性の評価

実施例７の３項で精製したレクチン耐性ＣＨＯ／ＣＣＲ４－ＬＣＡ株が生産した抗ＣＣＲ４キメラ抗体［以下、抗ＣＣＲ４キメラ抗体（４８％）と表記する］、実施例４の３項で精製したＹＢ２／０細胞由来の生産株が生産した抗ＣＣＲ４キメラ抗体ＫＭ２７６０－１［抗ＣＣＲ４キメラ抗体（８７％）］およびＣＨＯ／ＤＧ４４細胞由来の生産株５－０３株が生産した抗ＣＣＲ４キメラ抗体ＫＭ３０６０［抗ＣＣＲ４キメラ抗体（８％）］のｓｈＦｃγＲＩＩＩａに対する結合活性を実施例１１の３項に記載の方法に従って測定した。その結果、第３３図に示したように、レクチン耐性ＣＨＯ／ＣＣＲ４－ＬＣＡ株が生産した抗ＣＣＲ４キメラ抗体（４８％）は、５－０３株が生産した抗ＣＣＲ４キメラ抗体（８％）と比較して１００倍以上高いｓｈＦｃγＲＩＩＩａに対する結合活性を示した。また、その活性は、ＹＢ２／０細胞由来の生産株が生産した抗ＣＣＲ４キメラ抗体（８７％）の約１／３であった。

以上の結果は、レクチン耐性ＣＨＯ／ＤＧ４４細胞を用いることにより、親株細胞であるＣＨＯ／ＤＧ４４細胞を用いるよりも、１００倍以上ＦｃγＲＩＩＩａに対する結合活性の高い抗体を作製することが可能であることを明確に示すものである。

実施例１３．ｓｈＦｃγＲＩＩＩａに対する結合活性を指標とした高いＡＤＣＣ活性を有する抗体組成物のスクリーニング法

実施例７の１項で得られたＬＣＡ耐性株ＣＨＯ－ＬＣＡ株に、実施例１の２項（２）に記載の方法に従って、抗ＧＤ３キメラ抗体発現プラスミドｐＣＨｉ６４１ＬＨＧＭ４を導入し、薬剤ＭＴＸによる遺伝子増幅を行い、抗ＧＤ３キメラ抗体を生産する形質転換株を作製した。

得られた形質転換株を用いて限界希釈法によるクローン化を行い、複数個のクローンを得た。各クローンを培養し、コンフルエントになった時点で培養液を回収し、培養上清中の抗ＧＤ３キメラ抗体の濃度が１μｇ／ｍＬとなるように希釈し、該希釈抗体溶液を用いて実施例１１の１項に記載のＥＬＩＳＡ法により、ｓｈＦｃγＲＩＩＩａ結合活性を測定した。同時に、実施例１の４項で精製したＹＢ２／０細胞由来の生産株が生産した抗ＧＤ３キメラ抗体およびＣＨＯ／ＤＧ４４細胞由来の生産株が生産した抗ＧＤ３キメラ抗体を１μｇ／ｍＬに希釈した溶液を調製し、それらのｓｈＦｃγＲＩＩＩａ結合活性も測定した。

測定結果に基づき、ＣＨＯ／ＤＧ４４細胞由来の生産株が生産した抗ＧＤ３キメラ抗体の結合活性以上で、かつＹＢ２／０細胞由来の生産株が生産した抗ＧＤ３キメラ抗体の結合活性以下の活性を示す抗体を生産する形質転換細胞クローンを選択した。

選択した形質転換細胞クローンを実施例１の４項（２）に記載の方法に従って培養し、培養上清より精製抗体を取得した。精製抗体の単糖組成分析を実施例３の１項に記載の方法に従って行った結果、還元末端のＮ－アセチルグルコサミンの６位にフコースの１位がα結合していない糖鎖の割合は４２％であった。以下、本試料を抗ＧＤ３キメラ抗体（４２％）と表記する。精製した抗ＧＤ３キメラ抗体（４２％）の抗原結合活性は実施例１の３項に記載したＥＬＩＳＡ法を用いて評価した結果、実施例１の４項で精製したＹＢ２／０

細胞由来の生産株が生産した抗ＧＤ３キメラ抗体およびＣＨＯ／ＤＧ４４細胞由来の生産株が生産した抗ＧＤ３キメラ抗体と同等であった。さらに、実施例２の２項に記載した方法に従って各抗ＧＤ３キメラ抗体のＡＤＣＣ活性を評価した。比較のために、ＣＨＯ／ＤＧ４４細胞由来の生産株が生産した抗ＧＤ３キメラ抗体で、単糖組成分析の結果、還元末端のＮ－アセチルグルコサミンの６位にフコースの１位がα結合していない糖鎖の割合が１２％の試料［以下、抗ＧＤ３キメラ抗体（１２％）と表記する］のＡＤＣＣ活性を測定した。その結果を第３４図に示した。ＣＨＯ／ＤＧ４４細胞由来の生産株が生産した抗ＧＤ３キメラ抗体（１２％）と比較して、ｓｈＦｃγＲＩＩＩａに対する高い結合活性を指標に選択した生産株が生産した抗ＧＤ３キメラ抗体（４２％）では、約３０倍程度のＡＤＣＣ活性の上昇が観察された。

以上の結果から、ｓｈＦｃγＲＩＩＩａに対する結合活性の高い抗体組成物をスクリーニングすることで、高いＡＤＣＣ活性を有する抗体組成物をスクリーニングできることが明らかとなった。

実施例１４．ＦＧＦ－８ｂ／Ｆｃ融合蛋白質の作製

１．ＦＧＦ－８ｂ／Ｆｃ融合タンパクの発現ベクターの構築

ヒト化抗体発現用ベクターｐＫＡＮＴＥＸ９３（Ｍｏｌ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．，３７，１０３５（２０００））を制限酵素ＡｐａＩとＢａｍＨＩで切断してＱＩＡｑｕｉｃｋ Ｇｅｌ Ｅｘｔｒａｃｔｉｏｎ Ｋｉｔ（ＱＩＡＧＥＮ社製）を用いて約１．０ｋｂｐのヒトＩｇＧ１サブクラスＣＨ（ｈＣγ１）を含む断片を得た。プラスミドｐＢｌｕｅｓｃｒｉｐｔ ＩＩ ＳＫ（－）（ＳＴＲＡＴＡＧＥＮＥ社製）も同様の制限酵素で切断して約２．９ｋｂｐの断片を得た。これらの断片をＴＡＫＡＲＡ ＤＮＡ Ｌｉｇａｔｉｏｎ Ｋｉｔ Ｖｅｒ．２のｓｏｌｕｔｉｏｎ Ｉ（宝酒造社製）を用いて連結、大腸菌ＤＨ５α株（東洋紡社製）を形質転換してプラスミドｐｈＣγ１／ＳＫ（－）を構築した。

ｈＣγ１とＦＧＦ８のｃＤＮＡを連結するために配列番号８６で示した塩基配列を有する合成ＤＮＡを設計した。この合成ＤＮＡは５’末端にｐＢｌｕｅｓｃｒｉｐｔ ＩＩ ＳＫ（－）へクローニングするための複数の制限酵素認識配列を含んでおり、ＤＮＡの合成はプロリゴ社に委託した。ＴａＫａＲａ Ｅｘ Ｔａｑ添付ＥＸ Ｔａｑ Ｂｕｆｆｅｒ（Mg^{2+} ｐｌｕｓ）（宝酒造社製）を１倍濃度で含む５０μＬの溶液中にプラスミドｐｈＣγ１／ＳＫ（－）を１ｎｇ、０．２５ｍＭ ｄＮＴＰｓ、０．５μｍｏｌ／Ｌの配列番号８６に示した塩基配列を有する合成ＤＮＡ、０．５μＭのＭ１３ｐｒｉｍｅｒ Ｒ Ｖ、１．２５ＵｎｉｔのＴａＫａＲａ Ｅｘ Ｔａｑを含むように添加し、ＤＮＡサーマルサイクラーＧｅｎｅＡｍｐ ＰＣＲ Ｓｙｓｔｅｍ ９７００（ＰＥＲＫＩＮ ＥＬＭＥＲ社製）を用いて、９４℃にて３０秒間、５６℃にて３０秒間、７２℃にて１分間のサイクルを３５サイクル行った。該反応液全量をＱＩＡｑｕｉｃｋ ＰＣＲ ｐｕｒｉｆｉｃａｔｉｏｎ Ｋｉｔ（ＱＩＡＧＥＮ社製）を用いてＰＣＲ増幅断片を精製した。精製断片を制限酵素ＫｐｎＩとＢａｍＨＩで切断し、約０．７５ｋｂｐの断片を得た。また、プラスミドｐＢｌｕｅｓｃｒｉｐｔ ＩＩ ＳＫ（－）（ＳＴＲＡＴＡＧＥＮＥ社製）も同様の制限酵素で切断して約２．９ｋｂｐの断片を得た。これらの断片をＬｉｇａｔｉｏｎ ｈｉｇｈ（東洋紡績社製）を用いて連結、大腸菌ＤＨ５α株（東洋紡績社製）を形質転換してプラスミドｐΔｈＣγ１／ＳＫ（－）を構築した。

ＦＧＦ－８ｂ遺伝子がクローニングされているプラスミドｐＳＣ１７（Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．，８９，８９２８（１９９２））を鋳型として、下記のようにＰＣＲを行いＦＧＦ－８ｂの構造遺伝子領域断片を得た。ＴａＫａＲａ Ｅｘ Ｔａｑ添付ＥＸ Ｔａｑ Ｂｕｆｆｅｒ（Mg^{2+} ｐｌｕｓ）（宝酒造社製）を１倍濃度で含む５０μＬの溶液中にプラスミドｐＳＣ１７を１ｎｇ、０．２５ｍＭｄＮＴＰｓ、１０μｍｏｌ／Ｌの配列番号８７、８８に示した塩基配列を有する合成ＤＮＡ、２．５ＵｎｉｔのＴａＫａＲａ Ｅｘ Ｔａｑを含むように添加し、ＤＮＡサーマルサイクラーＧｅｎｅＡｍｐ ＰＣＲ Ｓｙｓｔｅｍ ９７００（ＰＥＲＫＩＮ ＥＬＭＥＲ社製）を用いて、９４℃にて１分間、５５℃にて１分間、７２℃にて２分間のサイクルを３０サイクル行い、さらに７２℃１０分間反応させた。該反応液全量からＰＣＲ増幅断片を精製し、精製断片を

制限酵素ＥｃｏＲＩとＢａｍＨＩで切断し、約０．６６ｋｂｐの断片を得た。また、プラスミドｐＢｌｕｅｓｃｒｉｐｔ ＩＩ ＳＫ（－）（ＳＴＲＡＴＡＧＥＮＥ社製）も同様の制限酵素で切断して約２．９ｋｂｐの断片を得た。これらの断片をＴ４ ＤＮＡ Ｌｉｇａｓｅ（宝酒造社製）を用いて連結、大腸菌ＤＨ５α株（東洋紡績社製）を形質転換してプラスミドｐＦＧＦ－８ｂ／ＳＫ（－）を構築した。

次に、プラスミドｐΔｈＣγ１／ＳＫ（－）を制限酵素ＡｐａＩとＥｃｏＲＩで切断し、約３．７ｋｂｐの断片を得た。また、プラスミドｐＦＧＦ－８ｂ／ＳＫ（－）も同様の制限酵素で切断し、約０．６ｋｂｐの断片を得た。これらの断片をＬｉｇａｔｉｏｎ ｈｉｇｈ（東洋紡績社製）を用いて連結、大腸菌ＤＨ５α株（東洋紡社製）を形質転換してプラスミドｐＦＧＦ８ｂ＋ｈＩｇＧ／ＳＫ（－）を構築した。

次に、上記で構築したプラスミドｐＦＧＦ８ｂ＋ｈＩｇＧ／ＳＫ（－）を制限酵素ＥｃｏＲＩとＢａｍＨＩで切断し、約１．３４ｋｂｐの断片を得た。またｐＫＡＮＴＥＸ９３も同様の制限酵素で処理し、約８．８ｋｂｐの断片を得た。これらの断片をＬｉｇａｔｉｏｎ ｈｉｇｈ（東洋紡績社製）を用いて連結、大腸菌ＤＨ５α株（東洋紡績社製）を形質転換して配列番号８９に示されるＦＧＦ８ｂ－Ｆｃ融合蛋白質のｃＤＮＡを含む動物細胞用発現ベクターｐＫＡＮＴＥＸ／ＦＧＦ８Ｆｃを構築した。

２．ＦＧＦ－８ｂ／Ｆｃ融合タンパクの動物細胞を用いた安定発現

上記実施例１４の１項で構築したＦＧＦ８－Ｆｃ融合蛋白質の動物細胞用発現ベクターｐＫＡＮＴＥＸ／ＦＧＦ８Ｆｃを各種細胞に導入し、優良株を選択することでＦＧＦ８－Ｆｃ融合蛋白質の安定発現株を以下のようにして作製した。

（１）ラットミエローマＹＢ２／０細胞を用いた生産細胞の作製

ＦＧＦ８－Ｆｃ融合蛋白質発現ベクターｐＫＡＮＴＥＸ／ＦＧＦ８Ｆｃの１０μｇを４×１０^{6}細胞のラットミエローマＹＢ２／０細胞へエレクトロポレーション法により導入後、２０～４０ｍＬのＲＰＭＩ１６４０－ＦＢＳ（１０）に懸濁し、９６ウェル培養用プレート（住友ベークライト社製）に２００μＬ／ウェルずつ分注した。５％CO_2インキュベーター内で３７℃、２４時間培養した後、Ｇ４１８を０．５ｍｇ／ｍＬになるように添加して１～２週間培養した。Ｇ４１８耐性を示す形質転換株のコロニーが出現し、増殖の認められたウェルより培養上清を回収し、上清中のＦＧＦ８－Ｆｃ融合蛋白質の抗ＦＧＦ－８抗体への結合活性を実施例１４の４項記載のＥＬＩＳＡ法により測定した。抗ＦＧＦ－８抗体としては、ＫＭ１３３４（ＵＳＰ５９５２４７２）を用いた。

培養上清中にＦＧＦ－８／Ｆｃ融合蛋白質の産生が認められたウェルの形質転換株については、ｄｈｆｒ遺伝子増幅系を利用し融合蛋白質の産生量を増加させる目的で、Ｇ４１８を０．５ｍｇ／ｍＬ、ＤＨＦＲの阻害剤であるＭＴＸ（ＳＩＧＭＡ社製）を５０ｎｍｏｌ／Ｌ含むＨｙｂｒｉｄｏｍａ－ＳＦＭ－ＦＢＳ（５）培地に懸濁し、２４ウェルプレート（Ｇｒｅｉｎｅｒ社製）に拡大培養した。５％CO_2インキュベーター内で３７℃で１～２週間培養して、５０ｎｍｏｌ／ＬＭＴＸ耐性を示す形質転換株を誘導した。形質転換株の増殖が認められたウェルの培養上清中のＦＧＦ８－Ｆｃ融合蛋白質のＫＭ１３３４への結合活性を実施例１４の４項記載のＥＬＩＳＡ法により測定した。

培養上清中にＦＧＦ－８／Ｆｃ融合蛋白質の産生が認められたウェルの形質転換株については、上記と同様の方法により、ＭＴＸ濃度を上昇させ、最終的にＧ４１８を０．５ｍｇ／ｍＬ、ＭＴＸを２００ｎｍｏｌ／Ｌの濃度で含むＨｙｂｒｉｄｏｍａ－ＳＦＭ－ＦＢＳ（５）培地で増殖可能かつ、ＦＧＦ８－Ｆｃ融合蛋白質を高生産する形質転換株ＫＣ１１７８を得た。ＫＣ１１７８は、ＷＯ００／６１７３９の実施例８に示されたＦＵＴ８遺伝子の転写物の定量法を用いて該転写物の量が比較的低い株であり、レクチン耐性であった。なお、ＫＣ１１７８は、平成１５年４月１日付けで独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センター（日本国茨城県つくば市東１丁目１番地 中央第６）にＦＥＲＭ ＢＰ－８３５０として寄託されている。

（２）ＣＨＯ／ＤＧ４４細胞を用いた生産細胞の作製

ＦＧＦ８－Ｆｃ融合蛋白質発現ベクターｐＫＡＮＴＥＸ／ＦＧＦ８Ｆｃの１０μｇを１．６×１０^{6}細胞のＣＨＯ／ＤＧ４４細胞へエレクトロポレーション法により導入後、３０

ｍＬのＩＭＤＭ－ｄＦＢＳ（１０）－ＨＴ（１）に懸濁し、９６ウェル培養用プレート（住友ベークライト社製）に１００μＬ／ウェルずつ分注した。５％CO_2インキュベーター内で３７℃、２４時間培養した後、ＩＭＤＭ－ｄＦＢＳ（１０）に培地交換し、１～２週間培養した。ＨＴ非依存的な増殖を示す形質転換株のコロニーが出現し、増殖の認められたウェルより培養上清を回収し、上清中のＦＧＦ８－Ｆｃ融合蛋白質のＫＭ１３３４への結合活性を実施例１４の４項記載のＥＬＩＳＡ法により測定した。

培養上清中にＦＧＦ－８／Ｆｃ融合蛋白質の産生が認められたウェルの形質転換株については、ｄｈｆｒ遺伝子増幅系を利用して抗体産生量を増加させる目的で、ＭＴＸ（ＳＩＧＭＡ社製）を５０ｎｍｏｌ／Ｌ含むＩＭＤＭ－ｄＦＢＳ（１０）培地に懸濁し、２４ウェルプレート（Ｇｒｅｉｎｅｒ社製）に拡大培養した。５％CO_2インキュベーター内で３７℃で１～２週間培養して、５０ｎｍｏｌ／Ｌ　ＭＴＸ耐性を示す形質転換株を誘導した。増殖が認められたウェルの培養上清中のＦＧＦ８－Ｆｃ融合蛋白質のＫＭ１３３４への結合活性を実施例１４の４項記載のＥＬＩＳＡ法により測定した。

培養上清中にＦＧＦ－８／Ｆｃ融合蛋白質の産生が認められたウェルの形質転換株については、上記と同様の方法により、ＭＴＸ濃度を上昇させ、ＭＴＸを５００ｎｍｏｌ／Ｌの濃度で含むＩＭＤＭ－ｄＦＢＳ（１０）培地で増殖可能かつ、ＦＧＦ８－Ｆｃ融合蛋白質を高生産する形質転換株ＫＣ１１７９を得た。なお、ＫＣ１１７９は、平成１５年４月１日付けで独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センター（日本国茨城県つくば市東１丁目１番地　中央第６）にＦＥＲＭ　ＢＰ－８３５１として寄託されている。

３．ＦＧＦ８－Ｆｃ融合蛋白質の精製

上記実施例１４の２項で作製したＦＧＦ８－Ｆｃ融合蛋白質の生産細胞を適当な培地（ＹＢ２／０細胞由来の細胞は５％ＧＦ２１（和光純薬製））、０．５ｍｇ／ｍＬ　Ｇ４１８、２００ｎｍｏｌ／ＬＭＴＸを含むＨ－ＳＦＭ、ＣＨＯ／ＤＧ４４細胞由来の細胞はＭＴＸを５００ｎｍｏｌ／Ｌを含むＥＸＣＥＬＬ３０１培地（ＪＲＨ社製））を用いて１００～２００ｍＬのスケールで培養した。培養上清よりＰｒｏｓｅｐ　Ｇ（ミリポア社製）カラムを使用説明書に従い、用いてＦＧＦ８－Ｆｃ融合蛋白質を精製した。精製蛋白質の推定アミノ酸配列を配列番号９０に示した。

４．抗ＦＧＦ－８抗体に対する結合活性

実施例１４の２項に記載のＹＢ２／０産生のＦＧＦ－８／Ｆｃ融合蛋白質と、ＣＨＯ産生のＦＧＦ－８／Ｆｃ融合蛋白質のＫＭ１３３４に対する結合活性を以下の様にしてＥＬＩＳＡ法を用いて測定した。９６ウェルのＥＬＩＳＡ用プレート（Ｇｒｅｉｎｅｒ社製）に、ＫＭ１３３４を１μｇ／ｍＬ、５０μＬ／ウェルで分注し、４℃で１晩放置して吸着させた。ＰＢＳで洗浄後、１％ＢＳＡ－ＰＢＳを１００μＬ／ウェルで加え、室温で１時間反応させて活性基をブロックした。各ウェルをＴｗｅｅｎ－ＰＢＳで洗浄後、形質転換株の培養上清あるいは精製蛋白質を５０μＬ／ウェルで加え、室温で時間反応させた。反応後、各ウェルをＴｗｅｅｎ－ＰＢＳで洗浄後、１％ＢＳＡ－ＰＢＳで３０００倍に希釈したペルオキシダーゼ標識ヤギ抗ヒトＩｇＧ（γ）抗体溶液（Ａｍｅｒｉｃａｎ　Ｑｕａｌｅｘ社製）を二次抗体溶液として、５０μＬ／ウェルで加え、室温で１時間反応させた。反応後、各ウェルをＴｗｅｅｎ－ＰＢＳで洗浄し、ＡＢＴＳ基質液を５０μＬ／ウェルで加えて反応させ、充分な発色後に５％ＳＤＳ溶液を５０μＬ／ウェル加えて反応を停止した。その後測定波長４１５ｎｍ、参照波長４９０ｎｍにて吸光度を測定した。第３５図に示したように、実施例１４の２項で得られたＦＧＦ－８／Ｆｃ融合蛋白質は、ＫＭ１３３４に対する結合活性を示した。

５．ＦｃγＲＩＩＩａに対する結合活性

実施例１４の２項に記載のＹＢ２／０産生のＦＧＦ－８／Ｆｃ融合蛋白質と、ＣＨＯ由来のＦＧＦ－８／Ｆｃ融合蛋白質のＦｃγＲＩＩＩａに対する結合活性を以下の様にしてＥＬＩＳＡ法を用いて測定した。

９６ウェルのＥＬＩＳＡ用プレート（Ｇｒｅｉｎｅｒ社製）に、Ｈｉｓ－ｔａｇに対するマウス抗体Ｔｅｔｒａ・Ｈｉｓ　Ａｎｔｉｂｏｄｙ（ＱＩＡＧＥＮ社製）を５μｇ／ｍＬ、５０μｌ／ウェルで分注し、４℃で一晩放置して吸着させた。ＰＢＳで洗浄後、１％Ｂ

ＳＡ－ＰＢＳを１００μＬ／ウェルで加え、室温で１時間反応させて残存する活性基をブロックした。各ウェルをＴｗｅｅｎ－ＰＢＳで洗浄後、１％ＢＳＡ－ＰＢＳで５μｇ／ｍＬに希釈したｓｈＦｃγＲＩＩＩａ（Ｖ）溶液を５０μＬ／ウェルで加え、室温で２時間反応させた。反応後、各ウェルをＴｗｅｅｎ－ＰＢＳで洗浄し、精製ＦＧＦ－８／Ｆｃ融合蛋白質を１％ＢＳＡ－ＰＢＳで各濃度に希釈した溶液を５０μＬ／ウェルで加え、室温で２時間反応させた。反応後、各ウェルをＴｗｅｅｎ－ＰＢＳで洗浄し、１％ＢＳＡ－ＰＢＳで１μｇ／ｍＬに希釈したビオチン化ＫＭ１３３４をそれぞれ５０μＬ／ウェルで加え、室温で１時間反応させた。反応後、各ウェルをＴｗｅｅｎ－ＰＢＳで洗浄し、ペルオキシダーゼ標識Ａｖｉｄｉｎ－Ｄ（Ｖｅｃｔｏｒ社製）を１％ＢＳＡ－ＰＢＳで４０００倍に希釈した溶液を５０μＬ／ウェルで加え、室温で１時間反応させた。反応後、Ｔｗｅｅｎ－ＰＢＳで洗浄し、ＡＢＴＳ基質液を５０μＬ／ウェルで加えて発色させ、１５分後に５％ＳＤＳ溶液を５０μＬ／ウェル加えて反応を停止した。その後測定波長４１５ｎｍ、参照波長４９０ｎｍにて吸光度を測定した。

第３６図には、各種のＦＧＦ－８／Ｆｃ融合蛋白質のｓｈＦｃγＲＩＩＩａ（Ｖ）に対する結合活性を測定した結果を示した。第３６図に示したように、ＹＢ２／０産生のＦＧＦ－８／Ｆｃ融合蛋白質はＣＨＯ／ＤＧ４４細胞が産生するＦＧＦ－８／Ｆｃ融合蛋白質よりも高いｓｈＦｃγＲＩＩＩａ（Ｖ）に対する結合活性を有していた。

参考例１．ＣＨＯ細胞由来の糖鎖合成に係わる各種酵素遺伝子の取得

１．ＣＨＯ細胞のＦＸ　ｃＤＮＡ配列の決定

（１）ＣＨＯ／ＤＧ４４細胞由来全ＲＮＡの抽出

ＣＨＯ／ＤＧ４４細胞を１０％ＦＢＳ（Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ社製）および１倍濃度のＨＴｓｕｐｐｌｅｍｅｎｔ（Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ社製）を添加したＩＭＤＭ培地（ＬｉｆｅＴｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ社製）に懸濁し、2×10^{5}個／ｍＬの密度で接着細胞培養用Ｔ７５フラスコ（Ｇｒｅｉｎｅｒ社製）に１５ｍＬ播種した。３７℃の５％CO_2インキュベーター内で培養し、培養２日目に1×10^{7}個を回収後、ＲＮＡｅａｓｙ（ＱＩＡＧＥＮ社製）により添付の説明書に従って全ＲＮＡを抽出した。

（２）ＣＨＯ／ＤＧ４４細胞由来全一本鎖ｃＤＮＡの調製

参考例１の１項（１）で調製した全ＲＮＡを４５μＬの滅菌水に溶解し、ＲＱ１　ＲＮａｓｅ－Ｆｒｅｅ　ＤＮａｓｅ（Ｐｒｏｍｅｇａ社製）１μＬ、付属の１０×ＤＮａｓｅ　ｂｕｆｆｅｒ　５μＬ、ＲＮａｓｉｎ　Ｒｉｂｏｎｕｃｌｅａｓｅ　ｉｎｈｉｂｉｔｏｒ（Ｐｒｏｍｅｇａ社製）０．５μＬをそれぞれに添加して、３７℃で３０分間反応させることにより、試料中に混入したゲノムＤＮＡを分解した。反応後、ＲＮＡｅａｓｙ（ＱＩＡＧＥＮ社製）により全ＲＮＡを再精製し、５０μＬの滅菌水に溶解した。

得られた各々の全ＲＮＡ３μＬに対しＳＵＰＥＲＳＣＲＩＰＴ^{TM}　Ｐｒｅａｍｐｌｉｆｉｃａｔｉｏｎ　Ｓｙｓｔｅｍ　ｆｏｒ　Ｆｉｒｓｔ　Ｓｔｒａｎｄ　ｃＤＮＡ　Ｓｙｎｔｈｅｓｉｓ（Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ社製）を用いて添付の説明書に従い、オリゴ（ｄＴ）をプライマーとした２０μＬの系で逆転写反応を行うことにより、一本鎖ｃＤＮＡを合成した。ＧＦＰＰおよびＦＸのクローニングには該反応液の５０倍希釈水溶液を使用した。使用するまで－８０℃で保管した。

（３）チャイニーズハムスターＦＸのｃＤＮＡ部分断片の取得

以下の手順によりチャイニーズハムスターＦＸのｃＤＮＡ部分断片を取得した。まず公的データーベースに登録されているヒトＦＸのｃＤＮＡ（Ｇｅｎｅｂａｎｋ登録番号Ｕ５８７６６）およびマウスのｃＤＮＡ（Ｇｅｎｅｂａｎｋ登録番号Ｍ３０１２７）に共通の塩基配列に対して特異的なプライマー（配列番号４２および配列番号４３に示す）を設計した。

次にＤＮＡポリメラーゼＥｘＴａｑ（宝酒造社製）を用いて、参考例１の１項（２）で調製したＣＨＯ／ＤＧ４４由来一本鎖ｃＤＮＡを１μＬを含む２５μＬの反応液［１倍濃度のＥｘＴａｑ　ｂｕｆｆｅｒ（宝酒造社製）、０．２ｍｍｏｌ／Ｌ　ｄＮＴＰｓ、０．５μｍｏｌ／Ｌ上記遺伝子特異的プライマー（配列番号４２および配列番号４３）］を調製

し、ＰＣＲを行った。ＰＣＲは９４℃で５分間の加熱の後、９４℃で１分、５８℃で２分間、７２℃で３分間からなる反応を１サイクルとして３０サイクルの後、さらに７２℃で１０分間加熱する条件で行った。
ＰＣＲ後、反応液を２％アガロースゲル電気泳動に供し、特異的増幅断片３０１ｂｐをＱｉａｅｘＩＩ　Ｇｅｌ　Ｅｘｔｒａｃｔｉｏｎ　ｋｉｔ（キアゲン社製）を用いて精製し、滅菌水２０μＬで溶出した（以下、アガロースゲルからのＤＮＡ断片の精製にはこの方法を用いた）。上記増幅断片４μＬをＴＯＰＯ　ＴＡ　ｃｌｏｎｉｎｇ　ｋｉｔ（ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ社製）の説明書に従って、プラスミドｐＣＲ２．１へ挿入し、該反応液を用いて大腸菌ＤＨ５αを形質転換し、得られたカナマイシン耐性クローンより公知の方法に従って各々プラスミドＤＮＡを単離した。その結果、ＦＸ　ｃＤＮＡ部分断片が組み込まれた２クローンを得た。各々ｐＣＲＦＸクローン８、ｐＣＲＦＸクローン１２と称す。
ＦＸクローン８、ＦＸクローン１２に挿入されたｃＤＮＡの塩基配列はＤＮＡシークエンサー３７７（Ｐａｒｋｉｎ　Ｅｌｍｅｒ社製）およびＢｉｇ　Ｄｙｅ　Ｔｅｒｍｉｎａｔｏｒ　Ｃｙｃｌｅ　Ｓｅｑｕｅｎｃｉｎｇ　ＦＳ　Ｒａｅｄｙ　Ｒｅａｃｔｉｏｎ　Ｋｉｔ（Ｐｅｒｋｉｎ　Ｅｌｍｅｒ社製）を使用して決定した。方法は添付のマニュアルに従った。本法により配列決定した挿入ｃＤＮＡがチャイニーズハムスターのＦＸのＯＲＦ部分配列をコードすることを確認した。
（４）ＲＡＣＥ用一本鎖ｃＤＮＡの合成
参考例１の１項（１）で抽出したＣＨＯ／ＤＧ４４細胞全ＲＮＡからの５’および３’ＲＡＣＥ用一本鎖ｃＤＮＡの作製を、ＳＭＡＲＴ™　ＲＡＣＥ　ｃＤＮＡ　Ａｍｐｌｉｆｉｃａｔｉｏｎ　Ｋｉｔ（ＣＬＯＮＴＥＣＨ社製）を用いて行った。方法は添付の説明書に従った。ただしＰｏｗｅｒＳｃｒｉｐｔ™　Ｒｅｖｅｒｓｅ　Ｔｒａｎｓｃｒｉｐｔａｓｅ（ＣＬＯＮＴＥＣＨ社製）を逆転写酵素として用いた。調製後の一本鎖ｃＤＮＡは各々、キット添付のＴｒｉｃｉｎ－ＥＤＴＡ　ｂｕｆｆｅｒで１０倍に希釈したものをＰＣＲの鋳型として用いた。
（５）ＲＡＣＥ法によるチャイニーズハムスターＦＸ全長ｃＤＮＡの決定
参考例１の１項（３）項で決定したチャイニーズハムスターＦＸの部分配列をもとにチャイニーズハムスターＦＸに特異的な５’ＲＡＣＥ用プライマーＦＸＧＳＰ１－１（配列番号４４）およびＦＸＧＳＰ１－２（配列番号４５）、チャイニーズハムスターＦＸ特異的な３’ＲＡＣＥ用プライマーＦＸＧＳＰ２－１（配列番号４６）およびＦＸＧＳＰ２－２（配列番号４７）を設計した。
次にＡｄｖａｎｔａｇｅ２　ＰＣＲ　Ｋｉｔ（ＣＬＯＮＴＥＣＨ社製）を用いて、参考例１の１項（４）で調製したＣＨＯ／ＤＧ４４細胞由来ＲＡＣＥ用一本鎖ｃＤＮＡを１μＬを含む５０μＬの反応液［１倍濃度のＡｄｖａｎｔａｇｅ　２　ＰＣＲ　ｂｕｆｆｅｒ（ＣＬＯＮＴＥＣＨ社製）、０．２ｍｍｏｌ／Ｌ　ｄＮＴＰｓ、０．２μｍｏｌ／ＬチャイニーズハムスターＦＸ特異的ＲＡＣＥ用プライマー、１倍濃度の共通プライマー（ＣＬＯＮＴＥＣＨ社製）］を調製し、ＰＣＲを行った。ＰＣＲは９４℃で５秒間、６８℃で１０秒間、７２℃で２分間からなる反応を１サイクルとして２０サイクル繰り返す条件で行った。
反応終了後、反応液より１μＬをとりＴｒｉｃｉｎ－ＥＤＴＡ　ｂｕｆｆｅｒで５０倍に希釈した水溶液１μＬをテンプレートとして使用し、再度反応液を調製し、同条件でＰＣＲを行った。一回目および２回目のＰＣＲで用いたテンプレート、プライマーの組み合わせおよび増幅されるＤＮＡ断片長を第６表に示した。

第６表

チャイニーズハムスターFXcDNA RACE PCRに用いた

プライマーの組み合わせとPCR産物の長さ

5'RACE	FX特異的プライマー	共通プライマー	PCR 増幅産物のサイズ
一回目	FXGSP1-1	UPM (Univarsal primer mix)	
二回目	FXGSP1-2	NUP (Nested Univarsal primer)	300bp

3'RACE	FX特異的プライマー	共通プライマー	PCR 増幅産物のサイズ
一回目	FXGSP2-1	UPM (Univarsal primer mix)	
二回目	FXGSP2-2	NUP (Nested Univarsal primer)	1100bp

ＰＣＲ後、反応液を１％アガロースゲル電気泳動に供し、目的の特異的増幅断片を回収し、滅菌水２０μＬで溶出した。上記増幅断片４μＬをＴＯＰＯ　ＴＡ　ｃｌｏｎｉｎｇ　ｋｉｔ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ社製）の説明書に従って、プラスミドｐＣＲ２．１へ挿入し、該反応液を用いて大腸菌ＤＨ５αを形質転換した。得られたカナマイシン耐性クローンよりプラスミドＤＮＡを単離し、チャイニーズハムスターＦＸの５’領域を含むｃＤＮＡ５クローンを得た。各々をＦＸ５’クローン２５、ＦＸ５’クローン２６、ＦＸ５’クローン２７、ＦＸ５’クローン２８、ＦＸ５’クローン３１、ＦＸ５’クローン３２と称す。

同様にチャイニーズハムスターＦＸの３’領域を含むｃＤＮＡ５クローンを得た。各々ＦＸ３’をＦＸ３’クローン１、ＦＸ３’クローン３、ＦＸ３’クローン６、ＦＸ３’クローン８、ＦＸ３’クローン９と称す。

上記、５’および３’ＲＡＣＥにより取得した各クローンのｃＤＮＡ部分の塩基配列は、ＤＮＡシークエンサー３７７（Ｐａｒｋｉｎ　Ｅｌｍｅｒ社製）を使用して決定した。方法は添付のマニュアルに従った。本法より決定した各ｃＤＮＡの塩基配列を比較し、ＰＣＲに伴う塩基の読み誤りを除き、チャイニーズハムスターＦＸｃＤＮＡ全長の塩基配列を決定した。決定した配列を配列番号４８に示す。

２．ＣＨＯ細胞のＧＦＰＰ　ｃＤＮＡ配列の決定

（１）チャイニーズハムスターＧＦＰＰのｃＤＮＡ部分断片の取得

以下の手順によりチャイニーズハムスターＧＦＰＰのｃＤＮＡ部分断片を取得した。まず公的データーベースに登録されているヒトＧＦＰＰのｃＤＮＡ（Ｇｅｎｅｂａｎｋ登録番号ＡＦ０１７４４５）、該配列と相同性の高いマウスＥＳＴ配列（Ｇｅｎｅｂａｎｋ登録番号ＡＩ４６７１９５、ＡＡ４２２６５８、ＢＥ３０４３２５、ＡＩ４６６４７４）、およびＲａｔ　ＥＳＴ配列（Ｇｅｎｅｂａｎｋ登録番号ＢＦ５４６３７２、ＡＩ０５８４００、ＡＷ１４４７８３）の塩基配列を比較し、３種間で保存性の高い領域にラットＧＦＰＰに特異的なプライマーＧＦＰＰ　ＦＷ９およびＧＦＰＰ　ＲＶ９（配列番号４９および配列番号５０）を設計した。

次にＤＮＡポリメラーゼＥｘＴａｑ（宝酒造社製）を用いて、参考例１の１項（２）で調製したＣＨＯ／ＤＧ４４細胞由来一本鎖ｃＤＮＡを１μＬを含む２５μＬの反応液［１倍濃度のＥｘＴａｑ　ｂｕｆｆｅｒ（宝酒造社製）、０．２ｍｍｏｌ／Ｌ　ｄＮＴＰｓ、０．５μｍｏｌ／Ｌ上記ＧＦＰＰ特異的プライマーＧＦＰＰ　ＦＷ９およびＧＦＰＰ　ＲＶ９（配列番号４９および配列番号５０）］を調製し、ＰＣＲを行った。ＰＣＲは９４℃で５分間の加熱の後、９４℃で１分、５８℃で２分間、７２℃で３分間からなる反応を１サイクルとして３０サイクルの後、さらに７２℃で１０分間加熱する条件で行った。

ＰＣＲ後、反応液を２％アガロースゲル電気泳動に供し、特異的増幅断片１．４Ｋｂｐを回収し、滅菌水２０μＬで溶出した。上記増幅断片４μＬをＴＯＰＯ　ＴＡ　ｃｌｏｎｉｎｇ　ｋｉｔ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ社製）の説明書に従って、プラスミドｐＣＲ２．１へ挿入し、該反応液を用いて大腸菌ＤＨ５αを形質転換した。得られたカナマイシン耐性クローンよりプラスミドＤＮＡを単離し、ＧＦＰＰ　ｃＤＮＡ部分断片が組み込まれた３

クローンを得た。各々ＧＦＰＰクローン８、ＧＦＰＰクローン１１、ＧＦＰＰクローン１２と称す。
ＧＦＰＰクローン８、ＧＦＰＰクローン１１、ＧＦＰＰクローン１２に挿入されたｃＤＮＡの塩基配列はＤＮＡシークエンサー３７７（Ｐａｒｋｉｎ　Ｅｌｍｅｒ社製）およびＢｉｇ　Ｄｙｅ　Ｔｅｒｍｉｎａｔｏｒ　Ｃｙｃｌｅ　Ｓｅｑｕｅｎｃｉｎｇ　ＦＳ　Ｒａｅｄｙ　Ｒｅａｃｔｉｏｎ　Ｋｉｔ（Ｐｅｒｋｉｎ　Ｅｌｍｅｒ社製）を使用して決定した。方法は添付のマニュアルに従った。本法により配列決定した挿入ｃＤＮＡがチャイニーズハムスターのＧＦＰＰのＯＲＦの部分配列をコードすることを確認した。
（２）ＲＡＣＥ法によるチャイニーズハムスターＧＦＰＰ全長ｃＤＮＡの決定
参考例１の２項（１）で決定したチャイニーズハムスターＦＸの部分配列をもとにチャイニーズハムスターＦＸに特異的な５’ＲＡＣＥ用プライマーＧＦＰＰ　ＧＳＰ１－１（配列番号５２）およびＧＦＰＰ　ＧＳＰ１－２（配列番号５３）、チャイニーズハムスターＧＦＰＰ特異的な３’ＲＡＣＥ用プライマーＧＦＰＰ　ＧＳＰ２－１（配列番号５４）およびＧＦＰＰ　ＧＳＰ２－２（配列番号５５）を設計した。
次にＡｄｖａｎｔａｇｅ２　ＰＣＲ　Ｋｉｔ（ＣＬＯＮＴＥＣＨ社製）を用いて、参考例１の１項（４）で調製したＣＨＯ／ＤＧ４４細胞由来ＲＡＣＥ用一本鎖ｃＤＮＡ１μＬを含む５０μＬの反応液［１倍濃度のＡｄｖａｎｔａｇｅ２　ＰＣＲ　ｂｕｆｆｅｒ（ＣＬＯＮＴＥＣＨ社製）、０．２ｍｍｏｌ／Ｌ　ｄＮＴＰｓ、０．２μｍｏｌ／Ｌチャイニーズハムスター ＧＦＰＰ特異的ＲＡＣＥ用プライマー、１倍濃度の共通プライマー（ＣＬＯＮＴＥＣＨ社製）］を調製し、ＰＣＲを行った。ＰＣＲは９４℃で５秒間、６８℃で１０秒間、７２℃で２分間からなる反応を１サイクルとして２０サイクル繰り返す条件で行った。
反応終了後、反応液より１μＬをとりＴｒｉｃｉｎ－ＥＤＴＡ　ｂｕｆｆｅｒで５０倍に希釈した水溶液１μＬをテンプレートとして、再度反応液を調製し、同条件でＰＣＲを行った。一回目および２回目のＰＣＲで用いたテンプレート、プライマーの組み合わせおよび増幅されるＤＮＡ断片長を第７表に示した。

第７表

チャイニーズハムスターGFPP cDNA RACE PCRに用いた
プライマーの組み合わせとPCR産物の長さ

5'RACE	GFPP特異的プライマー	共通プライマー	PCR増幅産物のサイズ
一回目	GFPPGSP1-1	UPM (Univarsal primer mix)	
二回目	GFPPGSP1-2	NUP (Nested Univarsal primer)	1100bp

3'RACE	GFPP特異的プライマー	共通プライマー	PCR増幅産物のサイズ
一回目	GFPPGSP2-1	UPM(Univarsal primer mix)	
二回目	GFPPGSP2-2	NUP(Nested Univarsal primer)	1400bp

ＰＣＲ後、反応液を１％アガロースゲル電気泳動に供し、目的の特異的増幅断片を回収し、滅菌水２０μＬで溶出した。上記増幅断片４μＬをＴＯＰＯ　ＴＡ　ｃｌｏｎｉｎｇ　ｋｉｔ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ社製）の説明書に従って、プラスミドｐＣＲ２．１へ挿入し、該反応液を用いて大腸菌ＤＨ５αを形質転換した。得られたカナマイシン耐性クローンよりプラスミドＤＮＡを単離し、チャイニーズハムスターＧＦＰＰの５’領域を含むｃＤＮＡ４クローンを得た。各々をＧＦＰＰ５’クローン１、ＧＦＰＰ５’クローン２、ＧＦＰＰ５’クローン３、ＧＦＰＰ５’クローン４と称す。
同様にチャイニーズハムスターＧＦＰＰの３’領域を含むｃＤＮＡ５クローンを得た。各々をＧＦＰＰ３’クローン１０、ＧＦＰＰ３’クローン１６、ＧＦＰＰ３’クローン２０と称す。
上記、５’および３’ＲＡＣＥにより取得した各クローンのｃＤＮＡ部分の塩基配列は、ＤＮＡシークエンサー３７７（Ｐａｒｋｉｎ　Ｅｌｍｅｒ社製）を使用して決定した。方

法は添付のマニュアルに従った。塩基配列決定後、各ｃＤＮＡの塩基配列を比較し、ＰＣＲに伴う塩基の読み誤りを除き、チャイニーズハムスターＧＦＰＰ　ｃＤＮＡ全長の塩基配列を決定した。決定した配列を配列番号５１に示す。

参考例２．ＣＨＯ細胞由来ＧＭＤ遺伝子の取得

１．ＣＨＯ細胞由来ＧＭＤ　ｃＤＮＡ配列の決定

（１）ＣＨＯ細胞由来ＧＭＤ遺伝子のｃＤＮＡ取得（５’および３’末端配列を除く部分ｃＤＮＡの取得）

ＧｅｎＢａｎｋに登録されているヒトＧＭＤ　ｃＤＮＡ配列（ＧｅｎＢａｎｋ　Ａｃｃｅｓｓｉｏｎ　Ｎｏ．ＡＦ０４２３７７）をクエリーとして、げっ歯類由来ＧＭＤ　ｃＤＮＡを公的データベース（ＢＬＡＳＴ）を用いて検索した結果、３種類のマウスＥＳＴ配列が得られた（ＧｅｎＢａｎｋ　Ａｃｃｅｓｓｓｉｏｎ　Ｎｏ．ＢＥ９８６８５６、ＢＦ１５８９８８、ＢＥ２８４７８５）。これらＥＳＴ配列を連結させることにより、推定されるマウスＧＭＤ　ｃＤＮＡ配列を決定した。

このマウスＧＭＤ　ｃＤＮＡ配列より、配列番号５６で示される塩基配列を有する２８ｍｅｒのプライマー、配列番号５７で示される塩基配列を有する２７ｍｅｒのプライマー、配列番号５８で示される塩基配列を有する２５ｍｅｒのプライマー、配列番号５９で示される塩基配列を有する２４ｍｅｒのプライマー、配列番号６０で示される塩基配列を有する２５ｍｅｒのプライマーを作製した。

続いて、ＣＨＯ細胞由来ＧＭＤ　ｃＤＮＡを増幅するために以下の方法でＰＣＲを行なった。実施例８の１項（１）で作製したＣＨＯ細胞由来一本鎖ｃＤＮＡ　０．５μＬを鋳型として含む２０μＬの反応液［１倍濃度のＥＸ　Ｔａｑ　Ｂｕｆｆｅｒ（宝酒造社製）、０．２ｍｍｏｌ／ＬのｄＮＴＰｓ、０．５単位のＥＸ　Ｔａｑ　ｐｏｌｙｍｅｒａｓｅ（宝酒造社製）、０．５μｍｏｌ／Ｌの合成ＤＮＡプライマー２種類］を調製した。なお、合成ＤＮＡプライマーには配列番号５６と配列番号５７、配列番号５８と配列番号５７、配列番号５６と配列番号５９、配列番号５６と配列番号６０の組み合わせを用いた。該反応液をＤＮＡサーマルサイクラー４８０（パーキンエルマー社製）を用いて９４℃にて５分間加熱した後、９４℃にて１分間、６８℃にて２分間のサイクルを３０サイクル行なった。

このＰＣＲ反応液をアガロース電気泳動にて分画した結果、配列番号５６と配列番号５７の合成ＤＮＡプライマーを用いたＰＣＲ産物では約１．２ｋｂｐ、配列番号５７と配列番号５９の合成ＤＮＡプライマーを用いたＰＣＲ産物では約１．１ｋｂｐ、配列番号５６と配列番号５９の合成ＤＮＡプライマーを用いたＰＣＲ産物では約３５０ｂｐ、配列番号５６と配列番号６０の合成ＤＮＡプライマーを用いたＰＣＲ産物では約１ｋｂｐのＤＮＡ断片が増幅された。これらＤＮＡ断片を回収し、ＤＮＡ　Ｌｉｇａｔｉｏｎ　ｋｉｔ（宝酒造社製）を用いてｐＴ７Ｂｌｕｅ（Ｒ）ベクター（Ｎｏｖａｇｅｎ社製）に連結し、得られた組換えプラスミドＤＮＡを用いて大腸菌ＤＨ５株（東洋紡績社製）を形質転換し、プラスミド２２－８（配列番号５６と配列番号５７の合成ＤＮＡプライマーから増幅された約１．２ｋｂｐのＤＮＡ断片を有する）、２３－３（配列番号５８と配列番号５７の合成ＤＮＡプライマーから増幅された約１．１ｋｂｐのＤＮＡ断片を有する）、３１－５（配列番号５６と配列番号５９の合成ＤＮＡプライマーから増幅された約３５０ｂｐのＤＮＡ断片を有する）、３４－２（配列番号５６と配列番号６０の合成ＤＮＡプライマーから増幅された約１ｋｂｐのＤＮＡ断片を有する）を得た。これらプラスミドに含まれるＣＨＯ細胞由来ＧＭＤ　ｃＤＮＡ配列を、ＤＮＡシークエンサーＡＢＩ　ＰＲＩＳＭ　３７７（パーキンエルマー社製）を用い、常法に従って決定した（５’末端側の開始メチオニンより下流２８塩基の配列、および３’末端側の終了コドンより上流２７塩基の配列は合成オリゴＤＮＡ配列由来のため、マウスＧＭＤ　ｃＤＮＡ配列である）。

さらに、プラスミド２２－８と３４－２に含まれるＣＨＯ細胞由来ＧＭＤ　ｃＤＮＡを組み合わせたプラスミドを作製するため、以下の工程を行った。プラスミド２２－８の１μｇを制限酵素ＥｃｏＲＩ（宝酒造社製）で３７℃にて１６時間反応後アガロース電気泳動にて分画し、約４ｋｂｐのＤＮＡ断片を回収した。プラスミド３４－２の２μｇを制限酵

素EcoRIで37℃にて16時間反応後アガロース電気泳動にて分画し、約150bpのDNA断片を回収した。それぞれ回収したDNA断片を、Calf Intestine Alkaline Phosphatase（宝酒造社製）で末端を脱リン酸化した後、DNA Ligation kit（宝酒造社製）を用いて連結し、得られた組換えプラスミドDNAを用いて大腸菌DH5α株（東洋紡績社製）を形質転換し、プラスミドCHO－GMDを得た（第37図）。

（2）CHO細胞由来GMD cDNAの5’末端配列の決定

ヒトおよびマウスGMD cDNAの5’末端側非コード（non－coding）領域の塩基配列より配列番号61で示される塩基配列を有する24merのプライマー、およびCHO由来GMD cDNA配列より配列番号62で示される塩基配列を有する32merのプライマーを作製し、cDNAを増幅するために以下の方法でPCRを行なった。実施例8の1項（1）で得られたCHO細胞由来の一本鎖cDNA0．5μLを鋳型として含む20μLの反応液［1倍濃度のEX Taq Buffer（宝酒造社製）、0．2mmol／LのdNTPs、0．5単位のEX Taq polymerase（宝酒造社製）、0．5μmol／Lの配列番号61と配列番号62の合成DNAプライマー］を調製し、DNAサーマルサイクラー480（パーキンエルマー社製）を用いて、94℃にて5分間加熱した後、94℃にて1分間、55℃にて1分間、72℃にて2分間のサイクルを20サイクル行なった後、さらに94℃にて1分間、68℃にて2分間のサイクルを18サイクル行なった。該PCR反応液をアガロース電気泳動にて分画後、約300bpのDNA断片を回収した。回収したDNA断片はDNA Ligation kit（宝酒造社製）を用いてpT7Blue（R）ベクター（Novagen社製）に連結し、得られた組換えプラスミドDNAを用いて大腸菌DH5α株（東洋紡績社製）を形質転換し、プラスミド5’GMDを得た。DNAシークエンサー377（パーキンエルマー社製）を用い、該プラスミドに含まれるCHO由来GMD cDNAの開始メチオニンより下流28塩基の配列を決定した。

（3）CHO細胞由来GMD cDNAの3’末端配列の決定

CHO細胞由来GMDの3’末端cDNA配列を得るため、以下の方法でRACE法を行なった。実施例8の1項（1）で取得したCHO細胞由来RNAより、3’RACE用一本鎖cDNAの作製をSMART^{TM} RACE cDNA Amplification Kit（CLONTECH社製）を用い、添付の説明書に従って行なった。ただし、逆転写酵素にはPowerScript^{TM} Reverse Transcriptase（CLONTECH社製）を用いた。調製後の一本鎖cDNAは、キット添付のTricin－EDTA bufferで10倍に希釈したものをPCRの鋳型として用いた。

続いて、上記3’RACE用一本鎖cDNA 1μLを鋳型として含む20μLの反応液［1倍濃度のEX Taq Buffer（宝酒造社製）、0．2mmol／L dNTPs、0．5単位のEX Taq polymerase（宝酒造社製）、0．5μmol／Lの配列番号63で示す24merの合成DNAプライマー［参考例2の1項（1）で決定したCHO細胞由来GMD cDNA配列より作製］、1倍濃度のUniversal Primer Mix（SMART^{TM} RACE cDNA Amplification Kitに付属；CLONTECH社製）］を調製し、DNAサーマルサイクラー480（パーキンエルマー社製）を用いて、94℃にて5分間加熱した後、94℃にて1分間、68℃にて2分間のサイクルを30サイクル行なった。

反応終了後、該PCR反応液より1μLを取り、Tricin－EDTA buffer（CLONTECH社製）で20倍希釈した水溶液1μLを鋳型として含む20μLの反応液［1倍濃度のEX Taq Buffer（宝酒造社製）、0．2mmol／L dNTPs、0．5単位のEX Taq polymerase（宝酒造社製）、0．5μmol／Lの配列番号64で示す25merの合成DNAプライマー［参考例2の1項（1）で決定したCHO細胞由来GMD cDNA配列より作製］、0．5μmol／LのNested Universal Primer（SMART^{TM} RACE cDN

Ａ　Ａｍｐｌｉｆｉｃａｔｉｏｎ　Ｋｉｔに付属；ＣＬＯＮＴＥＣＨ社製）］を調製し、ＤＮＡサーマルサイクラー４８０（パーキンエルマー社製）を用いて、９４℃にて５分間加熱した後、９４℃にて１分間、６８℃にて２分間のサイクルを３０サイクル行なった。反応終了後、該ＰＣＲ反応液をアガロース電気泳動にて分画後、約７００ｂｐのＤＮＡ断片を回収した。回収したＤＮＡはＤＮＡ　Ｌｉｇａｔｉｏｎ　ｋｉｔ（宝酒造社製）を用いてｐＴ７Ｂｌｕｅ（Ｒ）ベクター（Ｎｏｖａｇｅｎ社製）に連結し、得られた組換えプラスミドＤＮＡを用いて大腸菌ＤＨ５α株（東洋紡績社製）を形質転換し、プラスミド３’ＧＭＤを得た。ＤＮＡシークエンサー３７７（パーキンエルマー社製）を用い、該プラスミドに含まれるＣＨＯ由来ＧＭＤ　ｃＤＮＡの終止コドンより上流２７塩基の配列、および３’側のｎｏｎ－ｃｏｄｉｎｇ領域４１５ｂｐの塩基配列を決定した。

以上、参考例２の１項（１）、（２）、（３）より決定したＣＨＯ由来ＧＭＤ遺伝子の全長ｃＤＮＡ配列を配列番号６５、それに対応するアミノ酸配列を配列番号７１に示す。

２．ＣＨＯ／ＤＧ４４細胞のＧＭＤ遺伝子を含むゲノム配列の決定

参考例２の１項で決定したマウスＧＭＤ　ｃＤＮＡ配列より、配列番号６６で示される塩基配列を有する２５ｍｅｒのプライマーを作製した。続いて、以下の方法でＣＨＯ細胞由来ゲノムＤＮＡを取得した。ＣＨＯ／ＤＧ４４細胞由来ＫＣ８６１株をＩＭＤＭ－ｄＦＢＳ（１０）－ＨＴ（１）培地［ＨＴ　ｓｕｐｐｌｅｍｅｎｔ（インビトロジェン社製）を１倍濃度で含むＩＭＤＭ－ｄＦＢＳ（１０）培地］に3×10^{5}細胞／ｍＬになるように懸濁し、接着細胞用平底６ウェルプレート（Ｇｒｅｉｎｅｒ社製）に２ｍＬ／ウェルずつ分注した。３７℃の５％CO_2インキュベーター内でコンフルエントになるまで培養したのち、該プレートより公知の方法［ヌクレイック・アシッド・リサーチ（Ｎｕｃｌｅｉｃ　Ａｃｉｄｓ　Ｒｅｓｅａｒｃｈ），3，２３０３（１９７６）］に従ってゲノムＤＮＡを調製し、ＴＥ－ＲＮａｓｅ緩衝液（ｐＨ８．０）（１０ｍｍｏｌ／Ｌ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ、１ｍｍｏｌ／Ｌ　ＥＤＴＡ、２００μｇ／ｍＬ　ＲＮａｓｅ　Ａ）１５０μＬに一晩溶解した。

上記で取得したＣＨＯ／ＤＧ４４細胞由来ゲノムＤＮＡを１００ｎｇ、２０μＬの反応液［１倍濃度のＥＸ　Ｔａｑ　Ｂｕｆｆｅｒ（宝酒造社製）、０．２ｍｍｏｌ／Ｌ　ｄＮＴＰｓ、０．５単位のＥＸ　Ｔａｑ　ｐｏｌｙｍｅｒａｓｅ（宝酒造社製）、０．５μｍｏｌ／Ｌの配列番号５９と配列番号６６の合成ＤＮＡプライマー］を調製し、ＤＮＡサーマルサイクラー４８０（パーキンエルマー社製）を用いて、９４℃にて５分間加熱した後９４℃にて１分間、６８℃にて２分間のサイクルを３０サイクル行なった。反応終了後、該反応液をアガロース電気泳動にて分画後、約１００ｂｐのＤＮＡ断片を回収した。回収したＤＮＡ断片はＤＮＡ　Ｌｉｇａｔｉｏｎ　ｋｉｔ（宝酒造社製）を用いてｐＴ７Ｂｌｕｅ（Ｒ）ベクター（Ｎｏｖａｇｅｎ社製）に連結し、得られた組換えプラスミドＤＮＡを用いて大腸菌ＤＨ５α株（東洋紡績社製）を形質転換し、プラスミドｅｘ３を得た。ＤＮＡシークエンサー３７７（パーキンエルマー社製）を用いて該プラスミドに含まれるＣＨＯ細胞由来ゲノムＤＮＡの塩基配列を決定し、配列番号６７に示した。

次に、参考例２の１項で決定したＣＨＯ細胞由来ＧＭＤ　ｃＤＮＡ配列より、配列番号６８で示される塩基配列を有する２５ｍｅｒのプライマー、および配列番号６９で示される塩基配列を有する２５ｍｅｒのプライマーを作製した。続いて、ＣＨＯ／ＤＧ４４由来ゲノムＤＮＡを１００ｎｇ、２０μＬの反応液［１倍濃度のＥＸ　Ｔａｑ　Ｂｕｆｆｅｒ（宝酒造社製）、０．２ｍｍｏｌ／Ｌ　ｄＮＴＰｓ、０．５単位のＥＸ　Ｔｑ　ｐｏｌｙｍｅｒａｓｅ（宝酒造社製）、０．５μｍｏｌ／Ｌの配列番号６８と配列番号６９の合成ＤＮＡプライマー］を調製し、ＤＮＡサーマルサイクラー４８０（パーキンエルマー社製）を用いて、９４℃にて５分間加熱した後、９４℃にて１分間、６８℃にて２分間のサイクルを３０サイクル行なった。

反応終了後、該反応液をアガロース電気泳動にて分画後、約２００ｂｐのＤＮＡ断片を回収した。回収したＤＮＡ断片はＤＮＡ　Ｌｉｇａｔｉｏｎ　ｋｉｔ（宝酒造社製）を用いてｐＴ７Ｂｌｕｅ（Ｒ）ベクター（Ｎｏｖａｇｅｎ社製）に連結し、得られた組換えプラスミドＤＮＡを用いて大腸菌ＤＨ５α株（東洋紡績社製）を形質転換し、プラスミドｅｘ

４を得た。ＤＮＡシークエンサー３７７（パーキンエルマー社製）を用いて該プラスミドに含まれるＣＨＯ細胞由来ゲノムＤＮＡの塩基配列を決定し、配列番号７０に示した。

参考例３．抗ＦＧＦ－８キメラ抗体の作製

１．ＦＧＦ－８に対するマウス抗体のＶ領域をコードするｃＤＮＡの単離、解析（１）ＦＧＦ－８に対するマウス抗体生産ハイブリドーマ細胞からのｍＲＮＡの調製

ＦＧＦ－８に対するマウス抗体（抗ＦＧＦ－８マウス抗体）を生産するハイブリドーマＫＭ１３３４（ＦＥＲＭ　ＢＰ－５４５１）の1×10^{7}細胞より、ｍＲＮＡの調製キットであるＦａｓｔ　Ｔｒａｃｋ　ｍＲＮＡ　Ｉｓｏｌａｔｉｏｎ　Ｋｉｔ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ社製）を用いて、添付の使用説明書に従い、ｍＲＮＡを約８μｇ調製した。

（２）抗ＦＧＦ－８マウス抗体のＨ鎖およびＬ鎖ｃＤＮＡライブラリーの作製

参考例３の１項（１）で取得したＫＭ１３３４のｍＲＮＡの５μｇから、Ｔｉｍｅ　Ｓａｖｅｒ　ｃＤＮＡＳｙｎｔｈｅｓｉｓ　Ｋｉｔ（Ａｍｅｒｓｈａｍ　Ｐｈａｒｍａｃｉａ　Ｂｉｏｔｅｃｈ社製）を用いて、添付の使用説明書に従い、両端にＥｃｏＲＩ－ＮｏｔＩアダプターを有するｃＤＮＡを合成した。作製したｃＤＮＡ全量を２０μｌの滅菌水に溶解後、アガロースゲル電気泳動にて分画し、ＩｇＧクラスの抗体のＨ鎖に対応する約１．５ｋｂのｃＤＮＡ断片とκクラスのＬ鎖に対応する約１．０ｋｂのｃＤＮＡ断片をそれぞれ約０．１μｇ回収した。次に、各々の約１．５ｋｂのｃＤＮＡ断片０．１μｇおよび約１．０ｋｂのｃＤＮＡ断片０．１μｇと、制限酵素ＥｃｏＲＩで消化後、Ｃａｌｆ　Ｉｎｔｅｓｔｉｎｅ　Ａｌｋａｌｉｎｅ　Ｐｈｏｓｐｈａｔａｓｅで末端を脱リン酸化したλＺＡＰＩＩベクター１μｇをλＺＡＰＩＩ　Ｃｌｏｎｉｎｇ　Ｋｉｔ（Ｓｔｒａｔａｇｅｎｅ社製）を用いて、添付の使用説明書に従い、連結した。

連結後の各々の反応液のうち４μｌをＧｉｇａｐａｃｋ　ＩＩ　Ｐａｃｋａｇｉｎｇ　Ｅｘｔｒａｃｔｓ　Ｇｏｌｄ（Ｓｔｒａｔａｇｅｎｅ社製）を用いて、添付の使用説明書に従い、λファージにパッケージングし、適当量を大腸菌株ＸＬ１－Ｂｌｕｅ（Ｂｉｏｔｅｃｈｎｉｑｕｅｓ，５，３７６，１９８７）に感染させて、ＫＭ１３３４のＨ鎖ｃＤＮＡライブラリーおよびＬ鎖ｃＤＮＡライブラリーとしてそれぞれ約8.1×10^{4}個と、5.5×10^{4}個のファージクローンを取得した。次に各々のファージを常法（モレキュラー・クローニング第２版）に従い、ナイロンメンブレン上に固定した。

（３）抗ＦＧＦ－８マウス抗体のＨ鎖およびＬ鎖ｃＤＮＡのクローニング

参考例３の１項（２）で作製したＫＭ１３３４のＨ鎖ｃＤＮＡライブラリーおよびＬ鎖ｃＤＮＡライブリーのナイロンメンブレンを、ＥＣＬ　Ｄｉｒｅｃｔ　Ｎｕｃｌｅｉｃ　Ａｃｉｄ　Ｌａｂｅｌｌｉｎｇ　ａｎｄＤｅｔｅｃｔｉｏｎ　Ｓｙｓｔｅｍｓ（Ａｍｅｒｓｈａｍ　Ｐｈａｒｍａｃｉａ　Ｂｉｏｔｅｃｈ社製）を用いて、添付の使用説明書に従い、マウス抗体のＣ領域のｃＤＮＡ［Ｈ鎖はマウスＣγ１ｃＤＮＡを含むＤＮＡ断片（Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．，１４６，２０１０，１９９１）、Ｌ鎖はマウスＣκｃＤＮＡを含むＤＮＡ断片（Ｃｅｌｌ，２２，１９７，１９８０）］をプローブとして検出し、プローブに強く結合したファージクローンをＨ鎖、Ｌ鎖各１０クローン取得した。次に、λＺＡＰＩＩ　Ｃｌｏｎｉｎｇ　Ｋｉｔ（Ｓｔｒａｔａｇｅｎｅ社製）の使用説明書に従い、ｉｎ　ｖｉｖｏ　ｅｘｃｉｓｉｏｎ法により各ファージクローンをプラスミドに変換した。こうして得られた各プラスミドに含まれるｃＤＮＡの塩基配列をＢｉｇ　Ｄｙｅ　Ｔｅｒｍｉｎａｔｏｒ　Ｋｉｔ　ｖｅｒ．２（Ａｐｐｌｉｅｄｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ社製）を用いてジデオキシ法（モレキュラー・クローニング第２版）により決定した。その結果、ｃＤＮＡの５’末端に開始コドンと推定されるＡＴＧ配列が存在する完全長の機能的なＨ鎖ｃＤＮＡを含むプラスミドｐＫＭ１３３４Ｈ７－１およびＬ鎖ｃＤＮＡを含むプラスミドｐＫＭ１３３４Ｌ７－１を得た。

（４）抗ＦＧＦ－８マウス抗体のＶ領域のアミノ酸配列の解析

配列番号７２にプラスミドｐＫＭ１３３４Ｈ７－１に含まれていたＶＨの全塩基配列を、配列番号７３に推定された全アミノ酸配列を、配列番号７４にプラスミドｐＫＭ１３３４Ｌ７－１に含まれていたＶＬの全塩基配列を、配列番号７５に推定された全アミノ酸配列をそれぞれ示す。既知のマウス抗体の配列データ（Ｓｅｑｕｅｎｃｅｓ　ｏｆ　Ｐｒｏｔ

ｅｉｎｓ ｏｆ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｉｃａｌ Ｉｎｔｅｒｅｓｔ，ＵＳ Ｄｅｐｔ．Ｈｅａｌｔｈ ａｎｄ Ｈｕｍａｎ Ｓｅｒｖｉｃｅｓ，１９９１）との比較および精製した抗ＦＧＦ－８マウス抗体ＫＭ１３３４のＨ鎖およびＬ鎖のＮ末端アミノ酸配列をプロテインシーケンサーＰＰＳＱ－１０（島津製作所製）を用いて自動エドマン分解により解析した結果との比較から、単離した各々のｃＤＮＡは分泌シグナル配列を含む抗ＦＧＦ－８マウス抗体ＫＭ１３３４をコードする完全長ｃＤＮＡであり、Ｈ鎖については配列番号７３に記載のアミノ酸配列の１から１９番目が、Ｌ鎖については配列番号７５に記載のアミノ酸配列の１から１９番目が分泌シグナル配列であることが明らかとなった。

次に、抗ＦＧＦ－８マウス抗体ＫＭ１３３４のＶＨおよびＶＬのアミノ酸配列（分泌シグナル配列を除いた配列）の新規性について検討した。配列解析システムとしてＧＣＧ Ｐａｃｋａｇｅ（ｖｅｒｓｉｏｎ ９．１、Ｇｅｎｅｔｉｃｓ Ｃｏｍｐｕｔｅｒ Ｇｒｏｕｐ社製）を用い、既存の蛋白質のアミノ酸配列データベース（ＰＩＲ－Ｐｒｏｔｅｉｎ（Ｒｅｌｅａｓｅ ５６．０））をＢＬＡＳＴ法（Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．，２１５，４０３，１９９０）により検索した。その結果、Ｈ鎖、Ｌ鎖ともに完全に一致する配列は認められず、抗ＦＧＦ－８マウス抗体ＫＭ１３３４のＶＨおよびＶＬは新規なアミノ酸配列であることが確認された。

また、抗ＦＧＦ－８マウス抗体ＫＭ１３３４のＶＨおよびＶＬのＣＤＲを、既知の抗体のアミノ酸配列と比較することにより同定した。抗ＦＧＦ－８マウス抗体ＫＭ１３３４のＶＨのＣＤＲ１、２および３のアミノ酸配列をそれぞれ配列番号７６、７７および７８に、ＶＬのＣＤＲ１、２および３のアミノ酸配列をそれぞれ配列番号７９、８０および８１に示した。

２．抗ＦＧＦ－８キメラ抗体の動物細胞を用いた安定発現

（１）抗ＦＧＦ－８キメラ抗体発現ベクターｐＫＡＮＴＥＸ１３３４の構築

ＷＯ９７／１０３５４に記載のヒト化抗体発現用ベクターｐＫＡＮＴＥＸ９３と参考例３の１項（３）で得られたプラスミドｐＫＭ１３３４Ｈ７－１およびｐＫＭ１３３４Ｌ７－１を用いて抗ＦＧＦ－８キメラ抗体発現ベクターｐＫＡＮＴＥＸ１３３４を以下の様にして構築した。

参考例３の１項（３）で得られたプラスミドｐＫＭ１３３４Ｈ７－１の５０ｎｇを鋳型とし、配列番号２４、２５に記載の塩基配列を有する合成ＤＮＡ（ＧＥＮＳＥＴ社製）をプライマーとして終濃度０．３μＭとなるように加え、ＫＯＤ ｐｌｕｓ ｐｏｌｙｍｅｒａｓｅ（ＴＯＹＯＢＯ社製）に添付の取扱説明書に従い、５０μｌの系でまず９４℃で２分間加熱した後、９４℃１５秒間、５５℃３０秒間、６８℃１分間の条件で３０サイクルのＰＣＲを行った。該反応液をエタノール沈殿した後、滅菌水に溶解し、１０単位の制限酵素ＡｐａＩ（宝酒造社製）および１０単位の制限酵素ＮｏｔＩ（Ｎｅｗ Ｅｎｇｌａｎｄ Ｂｉｏｌａｂｓ社製）を用いて３７℃で１時間反応させた。該反応液をアガロースゲル電気泳動にて分画し、約０．４７ｋｂのＡｐａＩ－ＮｏｔＩ断片を約０．３μｇ回収した。

次に、ヒト化抗体発現用ベクターｐＫＡＮＴＥＸ９３の３μｇを１０単位の制限酵素ＡｐａＩ（宝酒造社製）および１０単位の制限酵素ＮｏｔＩ（Ｎｅｗ Ｅｎｇｌａｎｄ Ｂｉｏｌａｂｓ社製）を用いて３７℃で１時間反応させた。該反応液をアガロースゲル電気泳動にて分画し、約１２．７５ｋｂのＡｐａＩ－ＮｏｔＩ断片を約２μｇ回収した。

次に、上記で得られたＰＣＲ産物由来のＮｏｔＩ－ＡｐａＩ断片０．１μｇとプラスミドｐＫＡＮＴＥＸ９３由来のＮｏｔＩ－ＡｐａＩ断片０．１μｇを全量１０μｌの滅菌水に加え、Ｌｉｇａｔｉｏｎ Ｈｉｇｈ（ＴＯＹＯＢＯ社製）を用いて連結した。この様にして得られた組換えプラスミドＤＮＡ溶液を用いて大腸菌ＪＭ１０９株を形質転換し、第３８図に示したプラスミドｐＫＡＮＴＥＸ１３３４Ｈを得た。

次に、参考例１の１項（３）で得られたプラスミドｐＫＭ１３３４Ｌ７－１の５０ｎｇを鋳型とし、配列番号８２、８３に記載の塩基配列を有する合成ＤＮＡ（ＧＥＮＳＥＴ社製）をプライマーとして終濃度０．３μＭとなるように加え、ＫＯＤ ｐｌｕｓ ｐｏｌｙｍｅｒａｓｅ（ＴＯＹＯＢＯ社製）に添付の取扱説明書に従い、５０μｌの系でまず９４

℃で２分間加熱した後、９４℃１５秒間、５５℃３０秒間、６８℃１分間の条件で３０サイクルのＰＣＲを行った。該反応液をエタノール沈殿したのち滅菌水に溶解し、１０単位の制限酵素ＥｃｏＲＩ（宝酒造社製）および１０単位の制限酵素ＢｓｉＷＩ（Ｎｅｗ　Ｅｎｇｌａｎｄ　Ｂｉｏｌａｂｓ社製）を用いて３７℃で１時間反応させた。該反応液をアガロースゲル電気泳動にて分画し、約０．４４ｋｂのＥｃｏＲＩ－ＢｓｉＷＩ断片を約０．３μｇ回収した。

次に、上記で得られたプラスミドｐＫＡＮＴＥＸ１３３４Ｈの３μｇを１０単位の制限酵素ＥｃｏＲＩ（宝酒造社製）および制限酵素ＢｓｉＷＩ（Ｎｅｗ　Ｅｎｇｌａｎｄ　Ｂｉｏｌａｂｓ社製）を用いて３７℃で１時間反応させた。該反応液をアガロースゲル電気泳動にて分画し、約１３．２０ｋｂのＥｃｏＲＩ－ＢｓｉＷＩ断片を約２μｇ回収した。

次に、上記で得られたＰＣＲ産物由来のＥｃｏＲＩ－ＢｓｉＷＩ断片０．１μｇとプラスミドｐＫＡＮＴＥＸ１３３４Ｈ由来のＥｃｏＲＩ－ＢｓｉＷＩ断片０．１μｇを全量１０μｌの滅菌水に加え、Ｌｉｇａｔｉｏｎ　Ｈｉｇｈ（ＴＯＹＯＢＯ社製）を用いて連結した。この様にして得られた組換えプラスミドＤＮＡ溶液を用いて大腸菌ＪＭ１０９株を形質転換し、第３８図に示したプラスミドｐＫＡＮＴＥＸ１３３４を得た。

得られたプラスミドの４００ｎｇを用い、Ｂｉｇ　Ｄｙｅ　Ｔｅｒｍｉｎａｔｏｒ　Ｋｉｔ　ｖｅｒ．２（Ａｐｐｌｉｅｄｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ社製）を用いてジデオキシ法（モレキュラー・クローニング第２版）による塩基配列の解析を行った結果、目的のＤＮＡがクローニングされたプラスミドが得られたことを確認した。

産業上の利用可能性

本発明は、抗体組成物のＦｃγ受容体ＩＩＩａに対する結合活性を高める方法、抗体組成物の抗体依存性細胞障害活性を高める方法、抗体組成物のＦｃγ受容体ＩＩＩａに対する結合活性を高められた抗体組成物を製造する方法、抗体組成物中に含まれるＦｃ領域に結合する全Ｎ－グリコシド結合複合型糖鎖のうち、糖鎖還元末端のＮ－アセチルグルコサミンにフコースが結合していない糖鎖の割合を検出する方法、Ｎ－グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のＮ－アセチルグルコサミンの６位とフコースの１位がα結合した糖鎖構造を認識するレクチンに耐性を有する細胞を用いて製造されたＦｃ融合蛋白質組成物、およびその製造方法を提供することができる。

配列表フリーテキスト

配列番号４－人工配列の説明：合成ＤＮＡ

配列番号５－人工配列の説明：合成ＤＮＡ

配列番号８－人工配列の説明：合成ＤＮＡ

配列番号９－人工配列の説明：合成ＤＮＡ

配列番号１０－人工配列の説明：合成ＤＮＡ

配列番号１１－人工配列の説明：合成ＤＮＡ

配列番号１２－人工配列の説明：合成ＤＮＡ

配列番号１３－人工配列の説明：合成ＤＮＡ

配列番号１４－人工配列の説明：合成ＤＮＡ

配列番号１５－人工配列の説明：合成ＤＮＡ

配列番号１６－人工配列の説明：合成ＤＮＡ

配列番号１７－人工配列の説明：合成ＤＮＡ

配列番号１８－人工配列の説明：合成ＤＮＡ

配列番号２２－人工配列の説明：合成ＤＮＡ

配列番号２６－人工配列の説明：合成ＤＮＡ

配列番号２９－人工配列の説明：合成ＤＮＡ

配列番号３２－人工配列の説明：合成ＤＮＡ

配列番号３３－人工配列の説明：合成ＤＮＡ

配列番号３４－人工配列の説明：合成ＤＮＡ

配列番号３５－人工配列の説明：合成ＤＮＡ

配列番号３６－人工配列の説明：合成ＤＮＡ

配列番号３７－人工配列の説明：合成ＤＮＡ
配列番号３８－人工配列の説明：合成ＤＮＡ
配列番号３９－人工配列の説明：合成ＤＮＡ
配列番号４０－人工配列の説明：合成ＤＮＡ
配列番号４１－人工配列の説明：合成ＤＮＡ
配列番号４２－人工配列の説明：合成ＤＮＡ
配列番号４３－人工配列の説明：合成ＤＮＡ
配列番号４４－人工配列の説明：合成ＤＮＡ
配列番号４５－人工配列の説明：合成ＤＮＡ
配列番号４６－人工配列の説明：合成ＤＮＡ
配列番号４７－人工配列の説明：合成ＤＮＡ
配列番号４９－人工配列の説明：合成ＤＮＡ
配列番号５０－人工配列の説明：合成ＤＮＡ
配列番号５２－人工配列の説明：合成ＤＮＡ
配列番号５３－人工配列の説明：合成ＤＮＡ
配列番号５４－人工配列の説明：合成ＤＮＡ
配列番号５５－人工配列の説明：合成ＤＮＡ
配列番号５６－人工配列の説明：合成ＤＮＡ
配列番号５７－人工配列の説明：合成ＤＮＡ
配列番号５８－人工配列の説明：合成ＤＮＡ
配列番号５９－人工配列の説明：合成ＤＮＡ
配列番号６０－人工配列の説明：合成ＤＮＡ
配列番号６１－人工配列の説明：合成ＤＮＡ
配列番号６２－人工配列の説明：合成ＤＮＡ
配列番号６３－人工配列の説明：合成ＤＮＡ
配列番号６４－人工配列の説明：合成ＤＮＡ
配列番号６６－人工配列の説明：合成ＤＮＡ
配列番号６８－人工配列の説明：合成ＤＮＡ
配列番号６９－人工配列の説明：合成ＤＮＡ
配列番号８２－人工配列の説明：合成ＤＮＡ
配列番号８３－人工配列の説明：合成ＤＮＡ
配列番号８４－人工配列の説明：合成ＤＮＡ
配列番号８５－人工配列の説明：合成ＤＮＡ
配列番号８６－人工配列の説明：合成ＤＮＡ
配列番号８７－人工配列の説明：合成ＤＮＡ
配列番号８８－人工配列の説明：合成ＤＮＡ
配列番号８９－人工配列の説明：合成ＤＮＡ
【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD.

<120> Method of enhancing of binding activity of antibody composition to Fcγ receptor IIIa

<130> P044077

<150> P2002-106950
<151> 2002-04-09

<160> 100

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1
<211> 2008
<212> DNA
<213> *Cricetulus griseus*

<400> 1
aacagaaact tattttcctg tgtggctaac tagaaccaga gtacaatgtt tccaattctt 60
tgagctccga gaagacagaa gggagttgaa actctgaaaa tgcgggcatg gactggttcc 120
tggcgttgga ttatgctcat tctttttgcc tgggggacct tattgtttta tataggtggt 180
catttggttc gagataatga ccaccctgac cattctagca gagaactctc caagattctt 240
gcaaagctgg agcgcttaaa acaacaaaat gaagacttga ggagaatggc tgagtctctc 300
cgaataccag aaggccctat tgatcagggg acagctacag gaagagtccg tgttttagaa 360
gaacagcttg ttaaggccaa agaacagatt gaaaattaca agaaacaagc taggaatgat 420
ctgggaaagg atcatgaaat cttaaggagg aggattgaaa atggagctaa agagctctgg 480
ttttttctac aaagtgaatt gaagaaatta aagaaattag aaggaaacga actccaaaga 540
catgcagatg aaattctttt ggatttagga catcatgaaa ggtctatcat gacagatcta 600
tactacctca gtcaaacaga tggagcaggt gagtggcggg aaaaagaagc caaagatctg 660
acagagctgg tccagcggag aataacatat ctgcagaatc ccaaggactg cagcaaagcc 720
agaaagctgg tatgtaatat caacaaaggc tgtggctatg gatgtcaact ccatcatgtg 780
gtttactgct tcatgattgc ttatggcacc cagcgaacac tcatcttgga atctcagaat 840
tggcgctatg ctactggagg atgggagact gtgtttagac ctgtaagtga gacatgcaca 900
gacaggtctg gcctctccac tggacactgg tcaggtgaag tgaaggacaa aaatgttcaa 960

gtggtcgagc tccccattgt agacagcctc catcctcgtc ctccttactt acccttggct 1020
gtaccagaag accttgcaga tcgactcctg agagtccatg gtgatcctgc agtgtggtgg 1080
gtatcccagt ttgtcaaata cttgatccgt ccacaacctt ggctggaaag ggaaatagaa 1140
gaaaccacca agaagcttgg cttcaaacat ccagttattg gagtccatgt cagacgcact 1200
gacaaagtgg gaacagaagc agccttccat cccattgagg aatacatggt acacgttgaa 1260
gaacattttc agcttctcga acgcagaatg aaagtggata aaaaaagagt gtatctggcc 1320
actgatgacc cttctttgtt aaaggaggca aagacaaagt actccaatta tgaatttatt 1380
agtgataact ctatttcttg gtcagctgga ctacacaacc gatacacaga aaattcactt 1440
cggggcgtga tcctggatat acactttctc tcccaggctg acttccttgt gtgtactttt 1500
tcatcccagg tctgtagggt tgcttatgaa atcatgcaaa cactgcatcc tgatgcctct 1560
gcaaacttcc attctttaga tgacatctac tattttggag gccaaaatgc ccacaaccag 1620
attgcagttt atcctcacca acctcgaact aaagaggaaa tccccatgga acctggagat 1680
atcattggtg tggctggaaa ccattggaat ggttactcta aaggtgtcaa cagaaaacta 1740
ggaaaaacag gcctgtaccc ttcctacaaa gtccgagaga agatagaaac agtcaaatac 1800
cctacatatc ctgaagctga aaaatagaga tggagtgtaa gagattaaca acagaattta 1860
gttcagacca tctcagccaa gcagaagacc cagactaaca tatggttcat tgacagacat 1920
gctccgcacc aagagcaagt gggaaccctc agatgctgca ctggtggaac gcctctttgt 1980
gaagggctgc tgtgccctca agcccatg 2008

<210> 2
<211> 1728
<212> DNA
<213> Mus musculus

<400> 2
atgcgggcat ggactggttc ctggcgttgg attatgctca ttctttttgc ctgggggacc 60
ttgttatttt atataggtgg tcatttggtt cgagataatg accaccctga tcactccagc 120
agagaactct ccaagattct tgcaaagctt gaacgcttaa aacagcaaaa tgaagacttg 180
aggcgaatgg ctgagtctct ccgaatacca gaaggcccca ttgaccaggg gacagctaca 240
ggaagagtcc gtgttttaga agaacagctt gttaaggcca aagaacagat tgaaaattac 300
aagaaacaag ctagaaatgg tctggggaag gatcatgaaa tcttaagaag gaggattgaa 360
aatggagcta aagagctctg gtttttttcta caaagcgaac tgaagaaatt aaagcattta 420
gaaggaaatg aactccaaag acatgcagat gaaattcttt tggatttagg acaccatgaa 480
aggtctatca tgacagatct atactacctc agtcaaacag atggagcagg ggattggcgt 540
gaaaaagagg ccaaagatct gacagagctg gtccagcgga gaataacata tctccagaat 600
cctaaggact gcagcaaagc caggaagctg gtgtgtaaca tcaataaagg ctgtggctat 660
ggttgtcaac tccatcacgt ggtctactgt ttcatgattg cttatggcac ccagcgaaca 720

ctcatcttgg aatctcagaa ttggcgctat gctactggtg gatgggagac tgtgtttaga 780
cctgtaagtg agacatgtac agacagatct ggcctctcca ctggacactg gtcaggtgaa 840
gtaaatgaca aaaacattca agtggtcgag ctccccattg tagacagcct ccatcctcgg 900
cctccttact taccactggc tgttccagaa gaccttgcag accgactcct aagagtccat 960
ggtgaccctg cagtgtggtg ggtgtcccag tttgtcaaat acttgattcg tccacaacct 1020
tggctggaaa aggaaataga agaagccacc aagaagcttg gcttcaaaca tccagttatt 1080
ggagtccatg tcagacgcac agacaaagtg ggaacagaag cagccttcca ccccatcgag 1140
gagtacatgg tacacgttga agaacatttt cagcttctcg cacgcagaat gcaagtggat 1200
aaaaaaagag tatatctggc tactgatgat cctactttgt taaaggaggc aaagacaaag 1260
tactccaatt atgaatttat tagtgataac tctatttctt ggtcagctgg actacacaat 1320
cggtacacag aaaattcact tcggggtgtg atcctggata tacactttct ctcacaggct 1380
gactttctag tgtgtacttt ttcatcccag gtctgtcggg ttgcttatga aatcatgcaa 1440
accctgcatc ctgatgcctc tgcgaacttc cattctttgg atgacatcta ctattttgga 1500
ggccaaaatg cccacaatca gattgctgtt tatcctcaca aacctcgaac tgaagaggaa 1560
attccaatgg aacctggaga tatcattggt gtggctggaa accattggga tggttattct 1620
aaaggtatca acagaaaact tggaaaaaca ggcttatatc cctcctacaa agtccgagag 1680
aagatagaaa cagtcaagta tcccacatat cctgaagctg aaaaatag 1728

<210> 3
<211> 9196
<212> DNA
<213> Cricetulus griseus

<400> 3
tctagaccag gctggtctcg aactcacaga gaaccacctg cctctgccac ctgagtgctg 60
ggattaaagg tgtgcaccac caccgcccgg cgtaaaatca tatttttgaa tattgtgata 120
atttacatta taattgtaag taaaaatttt cagcctattt tgttatacat ttttgcgtaa 180
attattcttt tttgaaagtt ttgttgtcca taatagtcta gggaaacata aagttataat 240
ttttgtctat gtatttgcat atatatctat ttaatctcct aatgtccagg aaataaatag 300
ggtatgtaat agcttcaaca tgtggtatga tagaattttt cagtgctata taagttgtta 360
cagcaaagtg ttattaattc atatgtccat atttcaattt tttatgaatt attaaattga 420
atccttaagc tgccagaact agaattttat tttaatcagg aagccccaaa tctgttcatt 480
ctttctatat atgtggaaag gtaggcctca ctaactgatt cttcacctgt tttagaacat 540
ggtccaagaa tggagttatg taaggggaat tacaagtgtg agaaaactcc tagaaaacaa 600
gatgagtctt gtgaccttag tttctttaaa aacacaaaat tcttggaatg tgttttcatg 660
ttcctcccag gtggatagga gtgagtttat ttcagattat ttattacaac tggctgttgt 720
tacttgtttc tatgtcttta tagaaaaaca tatttttttt gccacatgca gcttgtcctt 780

atgattttat acttgtgtga ctcttaactc tcagagtata aattgtctga tgctatgaat 840
aaagttggct attgtatgag acttcagccc acttcaatta ttggcttcat tctctcagat 900
cccaccacct ccagagtggt aaacaacttg aaccattaaa cagactttag tctttatttg 960
aatgatagat ggggatatca gatttatagg cacagggttt tgagaaaggg agaaggtaaa 1020
cagtagagtt taacaacaac aaaaagtata ctttgtaaac gtaaaactat ttattaaagt 1080
agtagacaag acattaaata ttccttggga ttagtgcttt ttgaattttg ctttcaaata 1140
atagtcagtg agtatacccc tcccccattc tatattttag cagaaatcag aataaatggt 1200
gtttctggta cattcttttg tagagaattt attttctttg ggtttttgtg catttaaagt 1260
caataaaaat taaggttcag taatagaaaa aaaactctga tttttggaat ccccttttctt 1320
cagcttttct atttaatctc ttaatgataa tttaatttgt ggccatgtgg tcaaagtata 1380
tagccttgta tatgtaaatg ttttaaccaa cctgccttta cagtaactat ataattttat 1440
tctataatat atgacttttc ttccatagct ttagagttgc ccagtcactt taagttacat 1500
tttcatatat gttctttgtg ggaggagata attttatttc taagagaatc ctaagcatac 1560
tgattgagaa atggcaaaca aaacacataa ttaaagctga taaagaacga acatttggag 1620
tttaaaatac atagccaccc taagggttta actgttgtta gccttctttt ggaattttta 1680
ttagttcata tagaaaaatg gattttatcg tgacatttcc atatatgtat ataatatatt 1740
tacatcatat ccacctgtaa ttattagtgt ttttaaatat atttgaaaaa ataatggtct 1800
ggtttgatcc atttgaacct tttgatgttt ggtgtggttg ccaattggtt gatggttatg 1860
ataacctttg cttctctaag gttcaagtca gtttgagaat atgtcctcta aaaatgacag 1920
gttgcaagtt aagtagtgag atgacagcga gatggagtga tgagaatttg tagaaatgaa 1980
ttcacttata ctgagaactt gttttgcttt tagataatga acatattagc ctgaagtaca 2040
tagccgaatt gattaattat tcaaagatat aatcttttaa tccctataaa agaggtatta 2100
cacaacaatt caagaaagat agaattagac ttccagtatt ggagtgaacc atttgttatc 2160
aggtagaacc ctaacgtgtg tggttgactt aaagtgttta ctttttacct gatactgggt 2220
agctaattgt ctttcagcct cctggccaaa gataccatga aagtcaactt acgttgtatt 2280
ctatatctca aacaactcag ggtgtttctt actctttcca cagcatgtag agcccaggaa 2340
gcacaggaca agaaagctgc ctccttgtat caccaggaag atctttttgt aagagtcatc 2400
acagtatacc agagagacta attttgtctg aagcatcatg tgttgaaaca acagaaactt 2460
attttcctgt gtggctaact agaaccagag tacaatgttt ccaattcttt gagctccgag 2520
aagacagaag ggagttgaaa ctctgaaaat gcgggcatgg actggttcct ggcgttggat 2580
tatgctcatt ctttttgcct gggggacctt attgttttat ataggtggtc atttggttcg 2640
agataatgac caccctgacc attctagcag agaactctcc aagattcttg caaagctgga 2700
gcgcttaaaa caacaaaatg aagacttgag gagaatggct gagtctctcc ggtaggtttg 2760
aaatactcaa ggatttgatg aaatactgtg cttgaccttt aggtataggg tctcagtctg 2820
ctgttgaaaa atataatttc tacaaaccgt ctttgtaaaa ttttaagtat tgtagcagac 2880
tttttaaaag tcagtgatac atctatatag tcaatatagg tttacatagt tgcaatctta 2940
ttttgcatat gaatcagtat atagaagcag tggcatttat atgcttatgt tgcatttaca 3000
attatgttta gacgaacaca aactttatgt gatttggatt agtgctcatt aaatttttt 3060

attctatgga ctacaacaga gacataaatt ttgaaaggct tagttactct taaattctta 3120
tgatgaaaag caaaaattca ttgttaaata gaacagtgca tccggaatgt gggtaattat 3180
tgccatattt ctagtctact aaaaattgtg gcataactgt tcaaagtcat cagttgtttg 3240
gaaagccaaa gtctgattta aatggaaaac ataaacaatg atatctattt ctagatacct 3300
ttaacttgca gttactgagt ttacaagttg tctgacaact ttggattctc ttacttcata 3360
tctaagaatg atcatgtgta cagtgcttac tgtcacttta aaaaactgca gggctagaca 3420
tgcagatatg aagactttga cattagatgt ggtaattggc actaccagca agtggtatta 3480
agatacagct gaatatatta ctttttgagg aacataattc atgaatggaa agtggagcat 3540
tagagaggat gccttctggc tctcccacac cactgtttgc atccattgca tttcacactg 3600
cttttagaac tcagatgttt catatggtat attgtgtaac tcaccatcag ttttatcttt 3660
aaatgtctat ggatgataat gttgtatgtt aacactttta caaaaacaaa tgaagccata 3720
tcctcggtgt gagttgtgat ggtggtaatt gtcacaatag gattattcag caaggaacta 3780
agtcagggac aagaagtggg cgatactttg ttggattaaa tcattttact ggaagttcat 3840
cagggagggt tatgaaagtt gtggtctttg aactgaaatt atatgtgatt cattattctt 3900
gatttaggcc ttgctaatag taactatcat ttattgggaa tttgtcatat gtgccaattt 3960
gtcatgggcc agacagcgtg ttttactgaa tttctagata tctttatgag attctagtac 4020
tgttttcagc cattttacag atgaagaatc ttaaaaaatg ttaaataatt tagtttgccc 4080
aagattatac gttaacaaat ggtagaacct tctttgaatt ctggcagtat ggctacacag 4140
tccgaactct tatcttccta agctgaaaac agaaaaagca atgacccaga aaattttatt 4200
taaaagtctc aggagagact tcccatcctg agaagatctc ttttcccttt tataatttag 4260
gctcctgaat aatcactgaa ttttctccat gttccatcta tagtactgtt atttctgttt 4320
tccttttttc ttaccacaaa gtatcttgtt tttgctgtat gaaagaaaat gtgttattgt 4380
aatgtgaaat tctctgtccc tgcagggtcc cacatccgcc tcaatcccaa ataaacacac 4440
agaggctgta ttaattatga aactgttggt cagttggcta gggcttctta ttggctagct 4500
ctgtcttaat tattaaacca taactactat tgtaagtatt tccatgtggt cttatcttac 4560
caaggaaagg gtccagggac ctcttactcc tctggcgtgt tggcagtgaa gaggagagag 4620
cgatttccta tttgtctctg cttatttttct gattctgctc agctatgtca cttcctgcct 4680
ggccaatcag ccaatcagtg ttttattcat tagccaataa aagaaacatt tacacagaag 4740
gacttccccc atcatgttat ttgtatgagt tcttcagaaa atcatagtat cttttaatac 4800
taatttttat aaaaaattaa ttgtattgaa aattatgtgt atatgtgtct gtgtgtcgat 4860
ttgtgctcat aagtagcatg gagtgcagaa gagggaatca gatcttttt taagggacaa 4920
agagtttatt cagattacat tttaaggtga taatgtatga ttgcaaggtt atcaacatgg 4980
cagaaatgtg aagaagctgg tcacattaca tccagagtca agagtagaga gcaatgaatt 5040
gatgcatgca ttcctgtgct cagctcactt ttcctggagc tgagctgatt gtaagccatc 5100
tgatgtcttt gctgggaact aactcaaagg caagttcaaa acctgttctt aagtataagc 5160
catctctcca gtccctcata tggtctctta agacactttc tttatattct tgtacataga 5220
aattgaattc ctaacaactg cattcaaatt acaaaatagt ttttaaaagc tgatataata 5280
aatgtaaata caatctagaa catttttata aataagcata ttaactcagt aaaaataaat 5340

gcatggttat tttccttcat tagggaagta tgtctcccca ggctgttctc tagattctac 5400
tagtaatgct gtttgtacac catccacagg ggttttattt taaagctaag acatgaatga 5460
tggacatgct tgttagcatt tagacttttt tccttactat aattgagcta gtatttttgt 5520
gctcagtttg atatctgtta attcagataa atgtaatagt aggtaatttc tttgtgataa 5580
aggcatataa attgaagttg gaaaacaaaa gcctgaaatg acagttttta agattcagaa 5640
caataatttt caaaagcagt tacccaactt tccaaatata atctgcagtt ttcttgatat 5700
gtgataaatt tagacaaaga aatagcacat tttaaaatag ctatttactc ttgatttttt 5760
tttcaaattt aggctagttc actagttgtg tgtaaggtta tggctgcaaa catctttgac 5820
tcttggttag ggaatccagg atgatttacg tgtttggcca aaatcttgtt ccattctggg 5880
tttcttctct atctaggtag ctagcacaag ttaaaggtgt ggtagtattg gaaggctctc 5940
aggtatatat ttctatattc tgtatttttt tcctctgtca tatatttgct ttctgtttta 6000
ttgatttcta ctgttagttt gatacttact ttcttacact ttctttggga tttatttgc 6060
tgttctaaga tttcttagca agttcatatc actgatttta acagttgctt cttttgtaat 6120
atagactgaa tgccccttat ttgaaatgct tgggatcaga aactcagatt tgaacttttc 6180
ttttttaata tttccatcaa gtttaccagc tgaatgtcct gatccaagaa tatgaaatct 6240
gaaatgcttt gaaatctgaa acttttagag tgataaagct tccctttaaa ttaatttgtg 6300
ttctatattt tttgacaatg tcaacctttc attgttatcc aatgagtgaa catattttca 6360
attttttgt ttgatctgtt atattttgat ctgaccatat ttataaaatt ttatttaatt 6420
tgaatgttgt gctgttactt atctttatta ttatttttgc ttattttcta gccaaatgaa 6480
attatattct gtattatttt agtttgaatt ttactttgtg gcttagtaac tgcctttttgt 6540
tggtgaatgc ttaagaaaaa cgtgtggtct actgatattg gttctaatct tatatagcat 6600
gttgtttgtt aggtagttga ttatgctggt cagattgtct tgagtttatg caaatgtaaa 6660
atatttagat gcttgttttg ttgtctaaga acaaagtatg cttgctgtct cctatcggtt 6720
ctggtttttc cattcatctc ttcaagctgt tttgtgtgtt gaatactaac tccgtactat 6780
cttgttttct gtgaattaac ccctttttcaa aggtttcttt tctttttttt tttaagggac 6840
aacaagttta ttcagattac attttaagct gataatgtat gattgcaagg ttatcaacat 6900
ggcagaaatg tgaagaagct aggcacatta catccacatg gagtcaagag cagagagcag 6960
tgaattaatg catgcattcc tgtggtcagc tcacttttcc tattcttaga tagtctagga 7020
tcataaacct ggggaatagt gctaccacaa tgggcatatc cacttacttc agttcatgca 7080
atcaaccaag gcacatccac aggaaaaact gatttagaca acctctcatt gagactcttc 7140
ccagatgatt agactgtgtc aagttgacaa ttaaaactat cacacctgaa gccatcacta 7200
gtaaatataa tgaaaatgtt gattatcacc ataattcatc tgtatccctt tgttattgta 7260
gattttgtga agttcctatt caagtccctg ttccttcctt aaaaacctgt tttttagtta 7320
aataggtttt ttagtgttcc tgtctgtaaa tacttttta aagttagata ttatttcaa 7380
gtatgttctc ccagtctttg gcttgtattt tcatccctc aatacatata tttttgtaat 7440
ttatttttt tatttaaatt agaaacaaag ctgcttttac atgtcagtct cagttccctc 7500
tccctccct cctccctgc tccccaccta agccccaatt ccaactcctt tcttctcccc 7560
aggaagggtg aggccctcca tgggggaaat cttcaatgtc tgtcatatca tttggagcag 7620

ggcctagacc ctccccagtg tgtctaggct gagagagtat ccctctatgt ggagagggct 7680
cccaaagttc atttgtgtac taggggtaaa tactgatcca ctatcagtgg ccccatagat 7740
tgtccggacc tccaaactga cttcctcctt cagggagtct ggaacagttc tatgctggtt 7800
tcccagatat cagtctgggg tccatgagca acccccttgtt caggtcagtt gtttctgtag 7860
gtttccccag cccggtcttg acccctttgc tcatcacttc tccctctctg caactggatt 7920
ccagagttca gctcagtgtt tagctgtggg tgtctgcatc tgcttccatc agctactgga 7980
tgagggctct aggatggcat ataaggtagt catcagtctc attatcagag aagggctttt 8040
aaggtagcct cttgattatt gcttagattg ttagttgggg tcaaccttgt aggtctctgg 8100
acagtgacag aattctcttt aaacctataa tggctccctc tgtggtggta tccctttctc 8160
tgctctcatc cgttcctccc ctgactagat cttcctgctc cctcatgtcc tcctctcccc 8220
tccccttctc cccttctctt tcttctaact cccctctccc tccacccacg atccccatta 8280
gcttatgaga tcttgtcctt attttagcaa aacctttttg gctataaaat taattaattt 8340
aatatgctta tatcaggttt attttggcta gtatttgtat gtgtttggtt agtgttttta 8400
accttaattg acatgtatcc ttatatttag acacagattt aaatatttga agttttttt 8460
ttttttttt ttaaagattt atttattttt tatgtcttct gcctgcatgc cagaagaggg 8520
caccagatct cattcaaggt ggttgtgagc caccatgtgg ttgctgggaa ttgaactcag 8580
gacctctgga agaacagtca gtgctcttaa ccgctgagcc atctctccag cccctgaagt 8640
gtttctttta aagaggatag cagtgcatca tttttccctt tgaccaatga ctcctacctt 8700
actgaattgt tttagccatt tatatgtaat gctgttacca ggtttacatt ttcttttatc 8760
ttgctaaatt tcttccctgt ttgtctcatc tcttattttt gtctgttgga ttatataggc 8820
ttttattttt ctgtttttac agtaagttat atcaaattaa aattatttta tggaatgggt 8880
gtgttgacta catgtatgtc tgtgcaccat gtgctgacct ggtcttggcc agaagaaggt 8940
gtcatattct ctgaaactgg tattgtggat gttacgaact gccatagggt gctaggaatc 9000
aaaccccagc tcctctggaa aagcagccac tgctctgagc cactgagtcc tctcttcaag 9060
caggtgatgc caacttttaa tggttaccag tggataagag tgcttgtatc tctagcaccc 9120
atgaaaattt atgcattgct atatgggctt gtcacttcag cattgtgtga cagagacagg 9180
aggatcccaa gagctc 9196

<210> 4
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 4

actcatcttg gaatctcaga attgg 25

<210> 5
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 5
cttgaccgtt tctatcttct ctcg 24

<210> 6
<211> 979
<212> DNA
<213> Cricetulus griseus

<400> 6
actcatcttg gaatctcaga attggcgcta tgctactgga ggatgggaga ctgtgtttag 60
acctgtaagt gagacatgca cagacaggtc tggcctctcc actggacact ggtcaggtga 120
agtgaaggac aaaaatgttc aagtggtcga gctccccatt gtagacagcc tccatcctcg 180
tcctccttac ttacccttgg ctgtaccaga agaccttgca gatcgactcc tgagagtcca 240
tggtgatcct gcagtgtggt gggtatccca gtttgtcaaa tacttgatcc gtccacaacc 300
ttggctggaa agggaaatag aagaaaccac caagaagctt ggcttcaaac atccagttat 360
tggagtccat gtcagacgca ctgacaaagt gggaacagaa gcagccttcc atcccattga 420
ggaatacatg gtacacgttg aagaacattt tcagcttctc gaacgcagaa tgaaagtgga 480
taaaaaaaga gtgtatctgg ccactgatga cccttctttg ttaaaggagg caaagacaaa 540
gtactccaat tatgaattta ttagtgataa ctctatttct tggtcagctg gactacacaa 600
ccgatacaca gaaaattcac ttcggggcgt gatcctggat atacactttc tctcccaggc 660
tgacttcctt gtgtgtactt tttcatccca ggtctgtagg gttgcttatg aaatcatgca 720
aacactgcat cctgatgcct ctgcaaactt ccattcttta gatgacatct actattttgg 780
aggccaaaat gcccacaacc agattgcagt ttatcctcac caacctcgaa ctaaagagga 840
aatccccatg gaacctggag atatcattgg tgtggctgga aaccattgga atggttactc 900
taaaggtgtc aacagaaaac taggaaaaac aggcctgtac ccttcctaca aagtccgaga 960
gaagatagaa acggtcaag 979

<210> 7
<211> 979
<212> DNA
<213> Rattus norvegicus

<400> 7
actcatcttg gaatctcaga attggcgcta tgctactggt ggatgggaga ctgtgtttag 60
acctgtaagt gagacatgca cagacagatc tggcctctcc actggacact ggtcaggtga 120
agtgaatgac aaaaatattc aagtggtgga gctccccatt gtagacagcc ttcatcctcg 180
gcctccttac ttaccactgg ctgttccaga agaccttgca gatcgactcg taagagtcca 240
tggtgatcct gcagtgtggt gggtgtccca gttcgtcaaa tatttgattc gtccacaacc 300
ttggctagaa aaggaaatag aagaagccac caagaagctt ggcttcaaac atccagtcat 360
tggagtccat gtcagacgca cagacaaagt gggaacagag gcagccttcc atcccatcga 420
agagtacatg gtacatgttg aagaacattt tcagcttctc gcacgcagaa tgcaagtgga 480
taaaaaaaga gtatatctgg ctaccgatga ccctgctttg ttaaaggagg caaagacaaa 540
gtactccaat tatgaattta ttagtgataa ctctatttct tggtcagctg gactacacaa 600
tcggtacaca gaaaattcac ttcggggcgt gatcctggat atacactttc tctctcaggc 660
tgacttccta gtgtgtactt tttcatccca ggtctgtcgg gttgcttatg aaatcatgca 720
aaccctgcat cctgatgcct ctgcaaactt ccactcttta gatgacatct actattttgg 780
aggccaaaat gcccacaacc agattgccgt ttatcctcac aaacctcgaa ctgatgagga 840
aattccaatg gaacctggag atatcattgg tgtggctgga aaccattggg atggttattc 900
taaaggtgtc aacagaaaac ttggaaaaac aggcttatat ccctcctaca aagtccgaga 960
gaagatagaa acggtcaag 979

<210> 8
<211> 40
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 8
aagtataagc ttacatggat gacgatatcg ctgcgctcgt 40

<210> 9
<211> 40
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 9
atttaactgc aggaagcatt tgcggtggac gatggagggg 40

<210> 10
<211> 40
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 10
atttaaggta ccgaagcatt tgcggtgcac gatggagggg 40

<210> 11
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 11
ctccaattat gaatttatta gtg 23

<210> 12

<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 12
ggatgtttga agccaagctt cttgg 25

<210> 13
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 13
gtccatggtg atcctgcagt gtgg 24

<210> 14
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 14
caccaatgat atctccaggt tcc 23

<210> 15
<211> 24
<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 15
gatatcgctg cgctcgttgt cgac 24

<210> 16
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 16
caggaaggaa ggctggaaaa gagc 24

<210> 17
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 17
gatatcgctg cgctcgtcgt cgac 24

<210> 18
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 18

caggaaggaa ggctggaaga gagc 24

<210> 19

<211> 321

<212> PRT

<213> Cricetulus griseus

<400> 19

Met Gly Glu Pro Gln Gly Ser Arg Arg Ile Leu Val Thr Gly Gly Ser
1 5 10 15
Gly Leu Val Gly Arg Ala Ile Gln Lys Val Val Ala Asp Gly Ala Gly
20 25 30
Leu Pro Gly Glu Glu Trp Val Phe Val Ser Ser Lys Asp Ala Asp Leu
35 40 45
Thr Asp Ala Ala Gln Thr Gln Ala Leu Phe Gln Lys Val Gln Pro Thr
50 55 60
His Val Ile His Leu Ala Ala Met Val Gly Gly Leu Phe Arg Asn Ile
65 70 75 80
Lys Tyr Asn Leu Asp Phe Trp Arg Lys Asn Val His Ile Asn Asp Asn
85 90 95
Val Leu His Ser Ala Phe Glu Val Gly Thr Arg Lys Val Val Ser Cys
100 105 110
Leu Ser Thr Cys Ile Phe Pro Asp Lys Thr Thr Tyr Pro Ile Asp Glu
115 120 125
Thr Met Ile His Asn Gly Pro Pro His Ser Ser Asn Phe Gly Tyr Ser
130 135 140
Tyr Ala Lys Arg Met Ile Asp Val Gln Asn Arg Ala Tyr Phe Gln Gln
145 150 155 160
His Gly Cys Thr Phe Thr Ala Val Ile Pro Thr Asn Val Phe Gly Pro
165 170 175
His Asp Asn Phe Asn Ile Glu Asp Gly His Val Leu Pro Gly Leu Ile
180 185 190
His Lys Val His Leu Ala Lys Ser Asn Gly Ser Ala Leu Thr Val Trp
195 200 205

Gly Thr Gly Lys Pro Arg Arg Gln Phe Ile Tyr Ser Leu Asp Leu Ala
210 215 220
Arg Leu Phe Ile Trp Val Leu Arg Glu Tyr Asn Glu Val Glu Pro Ile
225 230 235 240
Ile Leu Ser Val Gly Glu Glu Asp Glu Val Ser Ile Lys Glu Ala Ala
245 250 255
Glu Ala Val Val Glu Ala Met Asp Phe Cys Gly Glu Val Thr Phe Asp
260 265 270
Ser Thr Lys Ser Asp Gly Gln Tyr Lys Lys Thr Ala Ser Asn Gly Lys
275 280 285
Leu Arg Ala Tyr Leu Pro Asp Phe Arg Phe Thr Pro Phe Lys Gln Ala
290 295 300
Val Lys Glu Thr Cys Ala Trp Phe Thr Asp Asn Tyr Glu Gln Ala Arg
305 310 315 320
Lys

<210> 20
<211> 590
<212> PRT
<213> Cricetulus griseus

<400> 20
Met Ala Ser Leu Arg Glu Ala Ser Leu Arg Lys Leu Arg Arg Phe Ser
1 5 10 15
Glu Met Arg Gly Lys Pro Val Ala Thr Gly Lys Phe Trp Asp Val Val
20 25 30
Val Ile Thr Ala Ala Asp Glu Lys Gln Glu Leu Ala Tyr Lys Gln Gln
35 40 45
Leu Ser Glu Lys Leu Lys Arg Lys Glu Leu Pro Leu Gly Val Asn Tyr
50 55 60
His Val Phe Thr Asp Pro Pro Gly Thr Lys Ile Gly Asn Gly Gly Ser
65 70 75 80
Thr Leu Cys Ser Leu Gln Cys Leu Glu Ser Leu Tyr Gly Asp Lys Trp
85 90 95
Asn Ser Phe Thr Val Leu Leu Ile His Ser Gly Gly Tyr Ser Gln Arg
100 105 110
Leu Pro Asn Ala Ser Ala Leu Gly Lys Ile Phe Thr Ala Leu Pro Leu

115 120 125

Gly Glu Pro Ile Tyr Gln Met Leu Asp Leu Lys Leu Ala Met Tyr Met
130 135 140

Asp Phe Pro Ser Arg Met Lys Pro Gly Val Leu Val Thr Cys Ala Asp
145 150 155 160

Asp Ile Glu Leu Tyr Ser Ile Gly Asp Ser Glu Ser Ile Ala Phe Glu
165 170 175

Gln Pro Gly Phe Thr Ala Leu Ala His Pro Ser Ser Leu Ala Val Gly
180 185 190

Thr Thr His Gly Val Phe Val Leu Asp Ser Ala Gly Ser Leu Gln His
195 200 205

Gly Asp Leu Glu Tyr Arg Gln Cys His Arg Phe Leu His Lys Pro Ser
210 215 220

Ile Glu Asn Met His His Phe Asn Ala Val His Arg Leu Gly Ser Phe
225 230 235 240

Gly Gln Gln Asp Leu Ser Gly Gly Asp Thr Thr Cys His Pro Leu His
245 250 255

Ser Glu Tyr Val Tyr Thr Asp Ser Leu Phe Tyr Met Asp His Lys Ser
260 265 270

Ala Lys Lys Leu Leu Asp Phe Tyr Glu Ser Val Gly Pro Leu Asn Cys
275 280 285

Glu Ile Asp Ala Tyr Gly Asp Phe Leu Gln Ala Leu Gly Pro Gly Ala
290 295 300

Thr Ala Glu Tyr Thr Lys Asn Thr Ser His Val Thr Lys Glu Glu Ser
305 310 315 320

His Leu Leu Asp Met Arg Gln Lys Ile Phe His Leu Leu Lys Gly Thr
325 330 335

Pro Leu Asn Val Val Val Leu Asn Asn Ser Arg Phe Tyr His Ile Gly
340 345 350

Thr Thr Glu Glu Tyr Leu Leu His Phe Thr Ser Asn Gly Ser Leu Gln
355 360 365

Ala Glu Leu Gly Leu Gln Ser Ile Ala Phe Ser Val Phe Pro Asn Val
370 375 380

Pro Glu Asp Ser His Glu Lys Pro Cys Val Ile His Ser Ile Leu Asn
385 390 395 400

Ser Gly Cys Cys Val Ala Pro Gly Ser Val Val Glu Tyr Ser Arg Leu
405 410 415

Gly Pro Glu Val Ser Ile Ser Glu Asn Cys Ile Ile Ser Gly Ser Val

420 425 430

Ile Glu Lys Ala Val Leu Pro Pro Cys Ser Phe Val Cys Ser Leu Ser
435 440 445

Val Glu Ile Asn Gly His Leu Glu Tyr Ser Thr Met Val Phe Gly Met
450 455 460

Glu Asp Asn Leu Lys Asn Ser Val Lys Thr Ile Ser Asp Ile Lys Met
465 470 475 480

Leu Gln Phe Phe Gly Val Cys Phe Leu Thr Cys Leu Asp Ile Trp Asn
485 490 495

Leu Lys Ala Met Glu Glu Leu Phe Ser Gly Ser Lys Thr Gln Leu Ser
500 505 510

Leu Trp Thr Ala Arg Ile Phe Pro Val Cys Ser Ser Leu Ser Glu Ser
515 520 525

Val Ala Ala Ser Leu Gly Met Leu Asn Ala Ile Arg Asn His Ser Pro
530 535 540

Phe Ser Leu Ser Asn Phe Lys Leu Leu Ser Ile Gln Glu Met Leu Leu
545 550 555 560

Cys Lys Asp Val Gly Asp Met Leu Ala Tyr Arg Glu Gln Leu Phe Leu
565 570 575

Glu Ile Ser Ser Lys Arg Lys Gln Ser Asp Ser Glu Lys Ser
580 585 590

<210> 21
<211> 25
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 21
Gln Val Thr Val Gln Ser Ser Pro Asn Phe Thr Gln His Val Arg Glu
1 5 10 15

Gln Ser Leu Val Thr Asp Gln Leu Cys
20 25

<210> 22
<211> 32
<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 22
taaatagaat tcggcatcat gtggcagctg ct 32

<210> 23
<211> 575
<212> PRT
<213> Cricetulus griseus

<400> 23
Met Arg Ala Trp Thr Gly Ser Trp Arg Trp Ile Met Leu Ile Leu Phe
1 5 10 15
Ala Trp Gly Thr Leu Leu Phe Tyr Ile Gly Gly His Leu Val Arg Asp
20 25 30
Asn Asp His Pro Asp His Ser Ser Arg Glu Leu Ser Lys Ile Leu Ala
35 40 45
Lys Leu Glu Arg Leu Lys Gln Gln Asn Glu Asp Leu Arg Arg Met Ala
50 55 60
Glu Ser Leu Arg Ile Pro Glu Gly Pro Ile Asp Gln Gly Thr Ala Thr
65 70 75 80
Gly Arg Val Arg Val Leu Glu Glu Gln Leu Val Lys Ala Lys Glu Gln
85 90 95
Ile Glu Asn Tyr Lys Lys Gln Ala Arg Asn Asp Leu Gly Lys Asp His
100 105 110
Glu Ile Leu Arg Arg Arg Ile Glu Asn Gly Ala Lys Glu Leu Trp Phe
115 120 125
Phe Leu Gln Ser Glu Leu Lys Lys Leu Lys Lys Leu Glu Gly Asn Glu
130 135 140
Leu Gln Arg His Ala Asp Glu Ile Leu Leu Asp Leu Gly His His Glu
145 150 155 160
Arg Ser Ile Met Thr Asp Leu Tyr Tyr Leu Ser Gln Thr Asp Gly Ala
165 170 175
Gly Glu Trp Arg Glu Lys Glu Ala Lys Asp Leu Thr Glu Leu Val Gln

180 185 190

Arg Arg Ile Thr Tyr Leu Gln Asn Pro Lys Asp Cys Ser Lys Ala Arg

195 200 205

Lys Leu Val Cys Asn Ile Asn Lys Gly Cys Gly Tyr Gly Cys Gln Leu

210 215 220

His His Val Val Tyr Cys Phe Met Ile Ala Tyr Gly Thr Gln Arg Thr

225 230 235 240

Leu Ile Leu Glu Ser Gln Asn Trp Arg Tyr Ala Thr Gly Gly Trp Glu

245 250 255

Thr Val Phe Arg Pro Val Ser Glu Thr Cys Thr Asp Arg Ser Gly Leu

260 265 270

Ser Thr Gly His Trp Ser Gly Glu Val Lys Asp Lys Asn Val Gln Val

275 280 285

Val Glu Leu Pro Ile Val Asp Ser Leu His Pro Arg Pro Pro Tyr Leu

290 295 300

Pro Leu Ala Val Pro Glu Asp Leu Ala Asp Arg Leu Leu Arg Val His

305 310 315 320

Gly Asp Pro Ala Val Trp Trp Val Ser Gln Phe Val Lys Tyr Leu Ile

325 330 335

Arg Pro Gln Pro Trp Leu Glu Arg Glu Ile Glu Glu Thr Thr Lys Lys

340 345 350

Leu Gly Phe Lys His Pro Val Ile Gly Val His Val Arg Arg Thr Asp

355 360 365

Lys Val Gly Thr Glu Ala Ala Phe His Pro Ile Glu Glu Tyr Met Val

370 375 380

His Val Glu Glu His Phe Gln Leu Leu Glu Arg Arg Met Lys Val Asp

385 390 395 400

Lys Lys Arg Val Tyr Leu Ala Thr Asp Asp Pro Ser Leu Leu Lys Glu

405 410 415

Ala Lys Thr Lys Tyr Ser Asn Tyr Glu Phe Ile Ser Asp Asn Ser Ile

420 425 430

Ser Trp Ser Ala Gly Leu His Asn Arg Tyr Thr Glu Asn Ser Leu Arg

435 440 445

Gly Val Ile Leu Asp Ile His Phe Leu Ser Gln Ala Asp Phe Leu Val

450 455 460

Cys Thr Phe Ser Ser Gln Val Cys Arg Val Ala Tyr Glu Ile Met Gln

465 470 475 480

Thr Leu His Pro Asp Ala Ser Ala Asn Phe His Ser Leu Asp Asp Ile

485 490 495

Tyr Tyr Phe Gly Gly Gln Asn Ala His Asn Gln Ile Ala Val Tyr Pro
500 505 510

His Gln Pro Arg Thr Lys Glu Glu Ile Pro Met Glu Pro Gly Asp Ile
515 520 525

Ile Gly Val Ala Gly Asn His Trp Asn Gly Tyr Ser Lys Gly Val Asn
530 535 540

Arg Lys Leu Gly Lys Thr Gly Leu Tyr Pro Ser Tyr Lys Val Arg Glu
545 550 555 560

Lys Ile Glu Thr Val Lys Tyr Pro Thr Tyr Pro Glu Ala Glu Lys
565 570 575

<210> 24
<211> 575
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 24

Met Arg Ala Trp Thr Gly Ser Trp Arg Trp Ile Met Leu Ile Leu Phe
1 5 10 15

Ala Trp Gly Thr Leu Leu Phe Tyr Ile Gly Gly His Leu Val Arg Asp
20 25 30

Asn Asp His Pro Asp His Ser Ser Arg Glu Leu Ser Lys Ile Leu Ala
35 40 45

Lys Leu Glu Arg Leu Lys Gln Gln Asn Glu Asp Leu Arg Arg Met Ala
50 55 60

Glu Ser Leu Arg Ile Pro Glu Gly Pro Ile Asp Gln Gly Thr Ala Thr
65 70 75 80

Gly Arg Val Arg Val Leu Glu Glu Gln Leu Val Lys Ala Lys Glu Gln
85 90 95

Ile Glu Asn Tyr Lys Lys Gln Ala Arg Asn Gly Leu Gly Lys Asp His
100 105 110

Glu Ile Leu Arg Arg Arg Ile Glu Asn Gly Ala Lys Glu Leu Trp Phe
115 120 125

Phe Leu Gln Ser Glu Leu Lys Lys Leu Lys His Leu Glu Gly Asn Glu
130 135 140

Leu Gln Arg His Ala Asp Glu Ile Leu Leu Asp Leu Gly His His Glu

145 150 155 160
Arg Ser Ile Met Thr Asp Leu Tyr Tyr Leu Ser Gln Thr Asp Gly Ala
165 170 175
Gly Asp Trp Arg Glu Lys Glu Ala Lys Asp Leu Thr Glu Leu Val Gln
180 185 190
Arg Arg Ile Thr Tyr Leu Gln Asn Pro Lys Asp Cys Ser Lys Ala Arg
195 200 205
Lys Leu Val Cys Asn Ile Asn Lys Gly Cys Gly Tyr Gly Cys Gln Leu
210 215 220
His His Val Val Tyr Cys Phe Met Ile Ala Tyr Gly Thr Gln Arg Thr
225 230 235 240
Leu Ile Leu Glu Ser Gln Asn Trp Arg Tyr Ala Thr Gly Gly Trp Glu
245 250 255
Thr Val Phe Arg Pro Val Ser Glu Thr Cys Thr Asp Arg Ser Gly Leu
260 265 270
Ser Thr Gly His Trp Ser Gly Glu Val Asn Asp Lys Asn Ile Gln Val
275 280 285
Val Glu Leu Pro Ile Val Asp Ser Leu His Pro Arg Pro Pro Tyr Leu
290 295 300
Pro Leu Ala Val Pro Glu Asp Leu Ala Asp Arg Leu Leu Arg Val His
305 310 315 320
Gly Asp Pro Ala Val Trp Trp Val Ser Gln Phe Val Lys Tyr Leu Ile
325 330 335
Arg Pro Gln Pro Trp Leu Glu Lys Glu Ile Glu Glu Ala Thr Lys Lys
340 345 350
Leu Gly Phe Lys His Pro Val Ile Gly Val His Val Arg Arg Thr Asp
355 360 365
Lys Val Gly Thr Glu Ala Ala Phe His Pro Ile Glu Glu Tyr Met Val
370 375 380
His Val Glu Glu His Phe Gln Leu Leu Ala Arg Arg Met Gln Val Asp
385 390 395 400
Lys Lys Arg Val Tyr Leu Ala Thr Asp Asp Pro Thr Leu Leu Lys Glu
405 410 415
Ala Lys Thr Lys Tyr Ser Asn Tyr Glu Phe Ile Ser Asp Asn Ser Ile
420 425 430
Ser Trp Ser Ala Gly Leu His Asn Arg Tyr Thr Glu Asn Ser Leu Arg
435 440 445
Gly Val Ile Leu Asp Ile His Phe Leu Ser Gln Ala Asp Phe Leu Val

450 455 460

Cys Thr Phe Ser Ser Gln Val Cys Arg Val Ala Tyr Glu Ile Met Gln
465 470 475 480
Thr Leu His Pro Asp Ala Ser Ala Asn Phe His Ser Leu Asp Asp Ile
485 490 495
Tyr Tyr Phe Gly Gly Gln Asn Ala His Asn Gln Ile Ala Val Tyr Pro
500 505 510
His Lys Pro Arg Thr Glu Glu Glu Ile Pro Met Glu Pro Gly Asp Ile
515 520 525
Ile Gly Val Ala Gly Asn His Trp Asp Gly Tyr Ser Lys Gly Ile Asn
530 535 540
Arg Lys Leu Gly Lys Thr Gly Leu Tyr Pro Ser Tyr Lys Val Arg Glu
545 550 555 560
Lys Ile Glu Thr Val Lys Tyr Pro Thr Tyr Pro Glu Ala Glu Lys
565 570 575

<210> 25
<211> 18
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 25
Asp Glu Ser Ile Tyr Ser Asn Tyr Tyr Leu Tyr Glu Ser Ile Pro Lys
1 5 10 15
Pro Cys

<210> 26
<211> 34
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 26
aataaaggat cctggggtca tttgtcttga gggt 34

<210> 27
<211> 788
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> CDS
<222> (13)..(774)

<400> 27

```
gaa ttc ggc atc atg tgg cag ctg ctc ctc cca act gct ctg cta ctt  48
                Met Trp Gln Leu Leu Leu Pro Thr Ala Leu Leu Leu
                  1               5                  10
cta gtt tca gct ggc atg cgg act gaa gat ctc cca aag gct gtg gtg  96
Leu Val Ser Ala Gly Met Arg Thr Glu Asp Leu Pro Lys Ala Val Val
         15                  20                  25
ttc ctg gag cct caa tgg tac agg gtg ctc gag aag gac agt gtg act 144
Phe Leu Glu Pro Gln Trp Tyr Arg Val Leu Glu Lys Asp Ser Val Thr
     30                  35                  40
ctg aag tgc cag gga gcc tac tcc cct gag gac aat tcc aca cag tgg 192
Leu Lys Cys Gln Gly Ala Tyr Ser Pro Glu Asp Asn Ser Thr Gln Trp
 45                  50                  55                  60
ttt cac aat gag agc ctc atc tca agc cag gcc tcg agc tac ttc att 240
Phe His Asn Glu Ser Leu Ile Ser Ser Gln Ala Ser Ser Tyr Phe Ile
                 65                  70                  75
gac gct gcc aca gtc gac gac agt gga gag tac agg tgc cag aca aac 288
Asp Ala Ala Thr Val Asp Asp Ser Gly Glu Tyr Arg Cys Gln Thr Asn
             80                  85                  90
ctc tcc acc ctc agt gac ccg gtg cag cta gaa gtc cat atc ggc tgg 336
Leu Ser Thr Leu Ser Asp Pro Val Gln Leu Glu Val His Ile Gly Trp
         95                  100                 105
ctg ttg ctc cag gcc cct cgg tgg gtg ttc aag gag gaa gac cct att 384
Leu Leu Leu Gln Ala Pro Arg Trp Val Phe Lys Glu Glu Asp Pro Ile
    110                 115                 120
cac ctg agg tgt cac agc tgg aag aac act gct ctg cat aag gtc aca 432
His Leu Arg Cys His Ser Trp Lys Asn Thr Ala Leu His Lys Val Thr
```

125 130 135 140

tat tta cag aat ggc aaa ggc agg aag tat ttt cat cat aat tct gac 480
Tyr Leu Gln Asn Gly Lys Gly Arg Lys Tyr Phe His His Asn Ser Asp
145 150 155

ttc tac att cca aaa gcc aca ctc aaa gac agc ggc tcc tac ttc tgc 528
Phe Tyr Ile Pro Lys Ala Thr Leu Lys Asp Ser Gly Ser Tyr Phe Cys
160 165 170

agg ggg ctt ttt ggg agt aaa aat gtg tct tca gag act gtg aac atc 576
Arg Gly Leu Phe Gly Ser Lys Asn Val Ser Ser Glu Thr Val Asn Ile
175 180 185

acc atc act caa ggt ttg gca gtg tca acc atc tca tca ttc ttt cca 624
Thr Ile Thr Gln Gly Leu Ala Val Ser Thr Ile Ser Ser Phe Phe Pro
190 195 200

cct ggg tac caa gtc tct ttc tgc ttg gtg atg gta ctc ctt ttt gca 672
Pro Gly Tyr Gln Val Ser Phe Cys Leu Val Met Val Leu Leu Phe Ala
205 210 215 220

gtg gac aca gga cta tat ttc tct gtg aag aca aac att cga agc tca 720
Val Asp Thr Gly Leu Tyr Phe Ser Val Lys Thr Asn Ile Arg Ser Ser
225 230 235

aca aga gac tgg aag gac cat aaa ttt aaa tgg aga aag gac cct caa 768
Thr Arg Asp Trp Lys Asp His Lys Phe Lys Trp Arg Lys Asp Pro Gln
240 245 250

gac aaa tga ccc cag gat cc 788
Asp Lys

<210> 28
<211> 254
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 28
Met Trp Gln Leu Leu Leu Pro Thr Ala Leu Leu Leu Leu Val Ser Ala
1 5 10 15

Gly Met Arg Thr Glu Asp Leu Pro Lys Ala Val Val Phe Leu Glu Pro
20 25 30

Gln Trp Tyr Arg Val Leu Glu Lys Asp Ser Val Thr Leu Lys Cys Gln
35 40 45

Gly Ala Tyr Ser Pro Glu Asp Asn Ser Thr Gln Trp Phe His Asn Glu
50 55 60
Ser Leu Ile Ser Ser Gln Ala Ser Ser Tyr Phe Ile Asp Ala Ala Thr
65 70 75 80
Val Asp Asp Ser Gly Glu Tyr Arg Cys Gln Thr Asn Leu Ser Thr Leu
85 90 95
Ser Asp Pro Val Gln Leu Glu Val His Ile Gly Trp Leu Leu Leu Gln
100 105 110
Ala Pro Arg Trp Val Phe Lys Glu Glu Asp Pro Ile His Leu Arg Cys
115 120 125
His Ser Trp Lys Asn Thr Ala Leu His Lys Val Thr Tyr Leu Gln Asn
130 135 140
Gly Lys Gly Arg Lys Tyr Phe His His Asn Ser Asp Phe Tyr Ile Pro
145 150 155 160
Lys Ala Thr Leu Lys Asp Ser Gly Ser Tyr Phe Cys Arg Gly Leu Phe
165 170 175
Gly Ser Lys Asn Val Ser Ser Glu Thr Val Asn Ile Thr Ile Thr Gln
180 185 190
Gly Leu Ala Val Ser Thr Ile Ser Ser Phe Phe Pro Pro Gly Tyr Gln
195 200 205
Val Ser Phe Cys Leu Val Met Val Leu Leu Phe Ala Val Asp Thr Gly
210 215 220
Leu Tyr Phe Ser Val Lys Thr Asn Ile Arg Ser Ser Thr Arg Asp Trp
225 230 235 240
Lys Asp His Lys Phe Lys Trp Arg Lys Asp Pro Gln Asp Lys
245 250

<210> 29
<211> 51
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 29
tgttggatcc tgtcaatgat gatgatgatg atgaccttga gtgatggtga t 51

<210> 30
<211> 620
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> CDS
<222> (13)..(609)

<400> 30

```
gaa ttc ggc atc atg tgg cag ctg ctc ctc cca act gct ctg cta ctt  48
                Met Trp Gln Leu Leu Leu Pro Thr Ala Leu Leu Leu
                  1               5                  10
cta gtt tca gct ggc atg cgg act gaa gat ctc cca aag gct gtg gtg  96
Leu Val Ser Ala Gly Met Arg Thr Glu Asp Leu Pro Lys Ala Val Val
         15                  20                  25
ttc ctg gag cct caa tgg tac agg gtg ctc gag aag gac agt gtg act 144
Phe Leu Glu Pro Gln Trp Tyr Arg Val Leu Glu Lys Asp Ser Val Thr
     30                  35                  40
ctg aag tgc cag gga gcc tac tcc cct gag gac aat tcc aca cag tgg 192
Leu Lys Cys Gln Gly Ala Tyr Ser Pro Glu Asp Asn Ser Thr Gln Trp
 45                  50                  55                  60
ttt cac aat gag agc ctc atc tca agc cag gcc tcg agc tac ttc att 240
Phe His Asn Glu Ser Leu Ile Ser Ser Gln Ala Ser Ser Tyr Phe Ile
                 65                  70                  75
gac gct gcc aca gtc gac gac agt gga gag tac agg tgc cag aca aac 288
Asp Ala Ala Thr Val Asp Asp Ser Gly Glu Tyr Arg Cys Gln Thr Asn
             80                  85                  90
ctc tcc acc ctc agt gac ccg gtg cag cta gaa gtc cat atc ggc tgg 336
Leu Ser Thr Leu Ser Asp Pro Val Gln Leu Glu Val His Ile Gly Trp
         95                 100                 105
ctg ttg ctc cag gcc cct cgg tgg gtg ttc aag gag gaa gac cct att 384
Leu Leu Leu Gln Ala Pro Arg Trp Val Phe Lys Glu Glu Asp Pro Ile
    110                 115                 120
cac ctg agg tgt cac agc tgg aag aac act gct ctg cat aag gtc aca 432
His Leu Arg Cys His Ser Trp Lys Asn Thr Ala Leu His Lys Val Thr
```

125 130 135 140

tat tta cag aat ggc aaa ggc agg aag tat ttt cat cat aat tct gac 480
Tyr Leu Gln Asn Gly Lys Gly Arg Lys Tyr Phe His His Asn Ser Asp
145 150 155

ttc tac att cca aaa gcc aca ctc aaa gac agc ggc tcc tac ttc tgc 528
Phe Tyr Ile Pro Lys Ala Thr Leu Lys Asp Ser Gly Ser Tyr Phe Cys
160 165 170

agg ggg ctt ttt ggg agt aaa aat gtg tct tca gag act gtg aac atc 576
Arg Gly Leu Phe Gly Ser Lys Asn Val Ser Ser Glu Thr Val Asn Ile
175 180 185

acc atc act caa ggt cat cat cat cat cat cat tga cag gat cc 620
Thr Ile Thr Gln Gly His His His His His His
190 195

<210> 31
<211> 199
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 31
Met Trp Gln Leu Leu Leu Pro Thr Ala Leu Leu Leu Leu Val Ser Ala
1 5 10 15
Gly Met Arg Thr Glu Asp Leu Pro Lys Ala Val Val Phe Leu Glu Pro
20 25 30
Gln Trp Tyr Arg Val Leu Glu Lys Asp Ser Val Thr Leu Lys Cys Gln
35 40 45
Gly Ala Tyr Ser Pro Glu Asp Asn Ser Thr Gln Trp Phe His Asn Glu
50 55 60
Ser Leu Ile Ser Ser Gln Ala Ser Ser Tyr Phe Ile Asp Ala Ala Thr
65 70 75 80
Val Asp Asp Ser Gly Glu Tyr Arg Cys Gln Thr Asn Leu Ser Thr Leu
85 90 95
Ser Asp Pro Val Gln Leu Glu Val His Ile Gly Trp Leu Leu Leu Gln
100 105 110
Ala Pro Arg Trp Val Phe Lys Glu Glu Asp Pro Ile His Leu Arg Cys
115 120 125
His Ser Trp Lys Asn Thr Ala Leu His Lys Val Thr Tyr Leu Gln Asn

130 135 140

Gly Lys Gly Arg Lys Tyr Phe His His Asn Ser Asp Phe Tyr Ile Pro
145 150 155 160
Lys Ala Thr Leu Lys Asp Ser Gly Ser Tyr Phe Cys Arg Gly Leu Phe
165 170 175
Gly Ser Lys Asn Val Ser Ser Glu Thr Val Asn Ile Thr Ile Thr Gln
180 185 190
Gly His His His His His His
195

<210> 32
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 32
aggaaggtgg cgctcatcac gggc 24

<210> 33
<211> 26
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 33
taaggccaca agtcttaatt gcatcc 26

<210> 34
<211> 27

<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 34
caggggtgtt cccttgagga ggtggaa 27

<210> 35
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 35
cccctcacgc atgaagcctg gag 23

<210> 36
<211> 28
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 36
ggcaggagac caccttgcga gtgcccac 28

<210> 37
<211> 28
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 37
ggcgctggct tacccggaga ggaatggg 28

<210> 38
<211> 28
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 38
aaaaggcctc agttagtgaa ctgtatgg 28

<210> 39
<211> 29
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 39
cgcggatcct caagcgttgg ggttggtcc 29

<210> 40
<211> 45
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 40
cccaagcttg ccaccatggc tcacgctccc gctagctgcc cgagc 45

<210> 41
<211> 31
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 41
ccggaattct gccaagtatg agccatcctg g 31

<210> 42
<211> 17
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 42
gccatccaga aggtggt 17

<210> 43
<211> 17
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 43
gtcttgtcag ggaagat 17

<210> 44
<211> 28
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 44
ggcaggagac caccttgcga gtgcccac 28

<210> 45
<211> 28
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 45
gggtgggctg taccttctgg aacagggc 28

<210> 46
<211> 28
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 46
ggcgctggct tacccggaga ggaatggg 28

<210> 47
<211> 28
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 47
ggaatgggtg tttgtctcctc caaagatgc 28

<210> 48
<211> 1316
<212> DNA
<213> Cricetulus griseus

<400> 48
gccccgcccc ctccacctgg accgagagta gctggagaat tgtgcaccgg aagtagctct 60
tggactggtg gaaccctgcg caggtgcagc aacaatgggt gagccccagg gatccaggag 120
gatcctagtg acaggggget ctggactggt gggcagagct atccagaagg tggtcgcaga 180
tggcgctggc ttacccggag aggaatgggt gtttgtctcc tccaaagatg cagatctgac 240
ggatgcagca caaacccaag ccctgttcca gaaggtacag cccacccatg tcatccatct 300
tgctgcaatg gtaggaggcc ttttccggaa tatcaaatac aacttggatt tctggaggaa 360
gaatgtgcac atcaatgaca acgtcctgca ctcagctttc gaggtgggca ctcgcaaggt 420
ggtctcctgc ctgtccacct gtatcttccc tgacaagacc acctatccta ttgatgaaac 480
aatgatccac aatggtccac cccacagcag caattttggg tactcgtatg ccaagaggat 540
gattgacgtg cagaacaggg cctacttcca gcagcatggc tgcaccttca ctgctgtcat 600
ccctaccaat gtctttggac ctcatgacaa cttcaacatt gaagatggcc atgtgctgcc 660
tggcctcatc cataaggtgc atctggccaa gagtaatggt tcagccttga ctgtttgggg 720
tacagggaaa ccacggaggc agttcatcta ctcactggac ctagcccggc tcttcatctg 780
ggtcctgcgg gagtacaatg aagttgagcc catcatcctc tcagtgggcg aggaagatga 840
agtctccatt aaggaggcag ctgaggctgt agtggaggcc atggacttct gtggggaagt 900
cacttttgat tcaacaaagt cagatgggca gtataagaag acagccagca atggcaagct 960
tcgggcctac ttgcctgatt tccgtttcac acccttcaag caggctgtga aggagacctg 1020
tgcctggttc accgacaact atgagcaggc ccggaagtga agcatgggac aagcgggtgc 1080

tcagctggca atgcccagtc agtaggctgc agtctcatca tttgcttgtc aagaactgag 1140
gacagtatcc agcaacctga gccacatgct ggtctctctg ccaggggget tcatgcagcc 1200
atccagtagg gcccatgttt gtccatcctc gggggaaggc cagaccaaca ccttgtttgt 1260
ctgcttctgc cccaacctca gtgcatccat gctggtcctg ctgtcccttg tctaga 1316

<210> 49
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 49
gatcctgctg ggaccaaaat tgg 23

<210> 50
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 50
cttaacatcc caagggatgc tg 22

<210> 51
<211> 1965
<212> DNA
<213> Cricetulus griseus

<400> 51
acgggggget cccggaagcg gggaccatgg cgtctctgcg cgaagcgagc ctgcggaagc 60
tgcggcgctt ttccgagatg agaggcaaac ctgtggcaac tgggaaattc tgggatgtag 120

ttgtaataac agcagctgac gaaaagcagg agcttgctta caagcaacag ttgtcggaga 180
agctgaagag aaaggaattg cccottggag ttaactacca tgttttcact gatcctcctg 240
gaaccaaaat tggaaatgga ggatcaacac tttgttctct tcagtgcctg gaaagcctct 300
atggagacaa gtggaattcc ttcacagtcc tgttaattca ctctggtggc tacagtcaac 360
gacttcccaa tgcaagcgct ttaggaaaaa tcttcacggc tttaccactt ggtgagccca 420
tttatcagat gttggactta aaactagcca tgtacatgga tttcccctca cgcatgaagc 480
ctggagtttt ggtcacctgt gcagatgata ttgaactata cagcattggg gactctgagt 540
ccattgcatt tgagcagcct ggctttactg ccctagccca tccatctagt ctggctgtag 600
gcaccacaca tggagtattt gtattggact ctgccggttc tttgcaacat ggtgacctag 660
agtacaggca atgccaccgt ttcctccata agcccagcat tgaaaacatg caccacttta 720
atgccgtgca tagactagga agctttggtc aacaggactt gagtgggggt gacaccacct 780
gtcatccatt gcactctgag tatgtctaca cagatagcct attttacatg gatcataaat 840
cagccaaaaa gctacttgat ttctatgaaa gtgtaggccc actgaactgt gaaatagatg 900
cctatggtga ctttctgcag gcactgggac ctggagcaac tgcagagtac accaagaaca 960
cctcacacgt cactaaagag gaatcacact tgttggacat gaggcagaaa atattccacc 1020
tcctcaaggg aacacccctg aatgttgttg tccttaataa ctccaggttt tatcacattg 1080
gaacaacgga ggagtatctg ctacatttca cttccaatgg ttcgttacag gcagagctgg 1140
gcttgcaatc catagctttc agtgtctttc caaatgtgcc tgaagactcc catgagaaac 1200
cctgtgtcat tcacagcatc ctgaattcag gatgctgtgt ggcccctggc tcagtggtag 1260
aatattccag attaggacct gaggtgtcca tctcggaaaa ctgcattatc agcggttctg 1320
tcatagaaaa agctgttctg cccccatgtt ctttcgtgtg ctctttaagt gtggagataa 1380
atggacactt agaatattca actatggtgt ttggcatgga agacaacttg aagaacagtg 1440
ttaaaaccat atcagatata aagatgcttc agttctttgg agtctgtttc ctgacttgtt 1500
tagatatttg gaaccttaaa gctatggaag aactattttc aggaagtaag acgcagctga 1560
gcctgtggac tgctcgaatt ttcccctgtct gttcttctct gagtgagtcg gttgcagcat 1620
cccttgggat gttaaatgcc attcgaaacc attcgccatt cagcctgagc aacttcaagc 1680
tgctgtccat ccaggaaatg cttctctgca aagatgtagg agacatgctt gcttacaggg 1740
agcaactctt tctagaaatc agttcaaaga gaaaacagtc tgattcggag aaatcttaaa 1800
tacaatggat tttgcctgga aacaggattg caaatgcagg catattctat agatctctgg 1860
gttcttcttt ctttctcccc tctctccttt cctttccctt tgatgtaatg acaaaggtaa 1920
aaatggccac ttctgatgga aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaa 1965

<210> 52
<211> 27
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 52
caggggtgtt cccttgagga ggtggaa 27

<210> 53
<211> 27
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 53
cactgagcca ggggccacac agcatcc 27

<210> 54
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 54
cccctcacgc atgaagcctg gag 23

<210> 55
<211> 27
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 55
tgccaccgtt tcctccataa gcccagc 27

<210> 56
<211> 28
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 56
atggctcaag ctcccgctaa gtgcccga 28

<210> 57
<211> 27
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 57
tcaagcgttt gggttggtcc tcatgag 27

<210> 58
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 58

tccggggatg gcgagatggg caagc 25

<210> 59
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 59
cttgacatgg ctctgggctc caag 24

<210> 60
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 60
ccacttcagt cggtcggtag tattt 25

<210> 61
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 61
cgctcacccg cctgaggcga catg 24

<210> 62
<211> 32
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 62
ggcaggtgct gtcggtgagg tcaccatagt gc 32

<210> 63
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 63
ggggccatgc caaggactat gtcg 24

<210> 64
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 64
atgtggctga tgttacaaaa tgatg 25

<210> 65

<211> 1504
<212> DNA
<213> Cricetulus griseus

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(1119)

<400> 65

```
atg gct cac gct ccc gct agc tgc ccg agc tcc agg aac tct ggg gac   48
Met Ala His Ala Pro Ala Ser Cys Pro Ser Ser Arg Asn Ser Gly Asp
 1               5                  10                  15
ggc gat aag ggc aag ccc agg aag gtg gcg ctc atc acg ggc atc acc   96
Gly Asp Lys Gly Lys Pro Arg Lys Val Ala Leu Ile Thr Gly Ile Thr
            20                  25                  30
ggc cag gat ggc tca tac ttg gca gaa ttc ctg ctg gag aaa gga tac  144
Gly Gln Asp Gly Ser Tyr Leu Ala Glu Phe Leu Leu Glu Lys Gly Tyr
        35                  40                  45
gag gtt cat gga att gta cgg cga tcc agt tca ttt aat aca ggt cga  192
Glu Val His Gly Ile Val Arg Arg Ser Ser Ser Phe Asn Thr Gly Arg
    50                  55                  60
att gaa cat tta tat aag aat cca cag gct cat att gaa gga aac atg  240
Ile Glu His Leu Tyr Lys Asn Pro Gln Ala His Ile Glu Gly Asn Met
65                  70                  75                  80
aag ttg cac tat ggt gac ctc acc gac agc acc tgc cta gta aaa atc  288
Lys Leu His Tyr Gly Asp Leu Thr Asp Ser Thr Cys Leu Val Lys Ile
                85                  90                  95
atc aat gaa gtc aaa cct aca gag atc tac aat ctt ggt gcc cag agc  336
Ile Asn Glu Val Lys Pro Thr Glu Ile Tyr Asn Leu Gly Ala Gln Ser
            100                 105                 110
cat gtc aag att tcc ttt gac tta gca gag tac act gca gat gtt gat  384
His Val Lys Ile Ser Phe Asp Leu Ala Glu Tyr Thr Ala Asp Val Asp
        115                 120                 125
gga gtt ggc acc ttg cgg ctt ctg gat gca att aag act tgt ggc ctt  432
Gly Val Gly Thr Leu Arg Leu Leu Asp Ala Ile Lys Thr Cys Gly Leu
    130                 135                 140
ata aat tct gtg aag ttc tac cag gcc tca act agt gaa ctg tat gga  480
Ile Asn Ser Val Lys Phe Tyr Gln Ala Ser Thr Ser Glu Leu Tyr Gly
145                 150                 155                 160
```

```
    150                 155                 160
aaa gtg caa gaa ata ccc cag aaa gag acc acc cct ttc tat cca agg   528
Lys Val Gln Glu Ile Pro Gln Lys Glu Thr Thr Pro Phe Tyr Pro Arg
165                 170                 175                 180
tcg ccc tat gga gca gcc aaa ctt tat gcc tat tgg att gta gtg aac   576
Ser Pro Tyr Gly Ala Ala Lys Leu Tyr Ala Tyr Trp Ile Val Val Asn
                185                 190                 195
ttt cga gag gct tat aat ctc ttt gcg gtg aac ggc att ctc ttc aat   624
Phe Arg Glu Ala Tyr Asn Leu Phe Ala Val Asn Gly Ile Leu Phe Asn
            200                 205                 210
cat gag agt cct aga aga gga gct aat ttt gtt act cga aaa att agc   672
His Glu Ser Pro Arg Arg Gly Ala Asn Phe Val Thr Arg Lys Ile Ser
        215                 220                 225
cgg tca gta gct aag att tac ctt gga caa ctg gaa tgt ttc agt ttg   720
Arg Ser Val Ala Lys Ile Tyr Leu Gly Gln Leu Glu Cys Phe Ser Leu
    230                 235                 240
gga aat ctg gac gcc aaa cga gac tgg ggc cat gcc aag gac tat gtc   768
Gly Asn Leu Asp Ala Lys Arg Asp Trp Gly His Ala Lys Asp Tyr Val
245                 250                 255                 260
gag gct atg tgg ctg atg tta caa aat gat gaa cca gag gac ttt gtc   816
Glu Ala Met Trp Leu Met Leu Gln Asn Asp Glu Pro Glu Asp Phe Val
                265                 270                 275
ata gct act ggg gaa gtt cat agt gtc cgt gaa ttt gtt gag aaa tca   864
Ile Ala Thr Gly Glu Val His Ser Val Arg Glu Phe Val Glu Lys Ser
            280                 285                 290
ttc atg cac att gga aag acc att gtg tgg gaa gga aag aat gaa aat   912
Phe Met His Ile Gly Lys Thr Ile Val Trp Glu Gly Lys Asn Glu Asn
        295                 300                 305
gaa gtg ggc aga tgt aaa gag acc ggc aaa att cat gtg act gtg gat   960
Glu Val Gly Arg Cys Lys Glu Thr Gly Lys Ile His Val Thr Val Asp
    310                 315                 320
ctg aaa tac tac cga cca act gaa gtg gac ttc ctg cag gga gac tgc  1008
Leu Lys Tyr Tyr Arg Pro Thr Glu Val Asp Phe Leu Gln Gly Asp Cys
325                 330                 335                 340
tcc aag gcg cag cag aaa ctg aac tgg aag ccc cgc gtt gcc ttt gac  1056
Ser Lys Ala Gln Gln Lys Leu Asn Trp Lys Pro Arg Val Ala Phe Asp
                345                 350                 355
gag ctg gtg agg gag atg gtg caa gcc gat gtg gag ctc atg aga acc  1104
```

Glu Leu Val Arg Glu Met Val Gln Ala Asp Val Glu Leu Met Arg Thr
360 365 370

aac ccc aac gcc tga gcacctctac aaaaaaattc gcgagacatg gactatggtg 1159
Asn Pro Asn Ala
375

cagagccagc caaccagagt ccagccactc ctgagaccat cgaccataaa ccctcgactg 1219
cctgtgtcgt ccccacagct aagagctggg ccacaggttt gtgggcacca ggacggggac 1279
actccagagc taaggccact tcgcttttgt caaaggctcc tctcaatgat tttgggaaat 1339
caagaagttt aaaatcacat actcatttta cttgaaatta tgtcactaga caacttaaat 1399
ttttgagtct tgagattgtt tttctctttt cttattaaat gatctttcta tgacccagca 1459
aaaaaaaaaa aaaaaaggga tataaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaa 1504

<210> 66
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 66
atgaagttgc actatggtga cctca 25

<210> 67
<211> 59
<212> DNA
<213> Cricetulus griseus

<400> 67
ccgacagcac ctgcctagta aaaatcatca atgaagtcaa acctacagag atctacaat 59

<210> 68
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 68
gacttagcag agtacactgc agatg 25

<210> 69
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 69
accttggata gaaaggggtg gtctc 25

<210> 70
<211> 125
<212> DNA
<213> Cricetulus griseus

<400> 70
ttgatggagt tggcaccttg cggcttctgg atgcaattaa gacttgtggc cttataaatt 60
ctgtgaagtt ctaccaggcc tcaactagtg aactgtatgg aaaagtgcaa gaaatacccc 120
agaaa 125

<210> 71
<211> 376
<212> PRT
<213> Cricetulus griseus

<400> 71
Met Ala His Ala Pro Ala Ser Cys Pro Ser Ser Arg Asn Ser Gly Asp

1 5 10 15
Gly Asp Lys Gly Lys Pro Arg Lys Val Ala Leu Ile Thr Gly Ile Thr
20 25 30
Gly Gln Asp Gly Ser Tyr Leu Ala Glu Phe Leu Leu Glu Lys Gly Tyr
35 40 45
Glu Val His Gly Ile Val Arg Arg Ser Ser Ser Phe Asn Thr Gly Arg
50 55 60
Ile Glu His Leu Tyr Lys Asn Pro Gln Ala His Ile Glu Gly Asn Met
65 70 75 80
Lys Leu His Tyr Gly Asp Leu Thr Asp Ser Thr Cys Leu Val Lys Ile
85 90 95 100
Ile Asn Glu Val Lys Pro Thr Glu Ile Tyr Asn Leu Gly Ala Gln Ser
105 110 115
His Val Lys Ile Ser Phe Asp Leu Ala Glu Tyr Thr Ala Asp Val Asp
120 125 130
Gly Val Gly Thr Leu Arg Leu Leu Asp Ala Ile Lys Thr Cys Gly Leu
135 140 145
Ile Asn Ser Val Lys Phe Tyr Gln Ala Ser Thr Ser Glu Leu Tyr Gly
150 155 160
Lys Val Gln Glu Ile Pro Gln Lys Glu Thr Thr Pro Phe Tyr Pro Arg
165 170 175 180
Ser Pro Tyr Gly Ala Ala Lys Leu Tyr Ala Tyr Trp Ile Val Val Asn
185 190 195
Phe Arg Glu Ala Tyr Asn Leu Phe Ala Val Asn Gly Ile Leu Phe Asn
200 205 210
His Glu Ser Pro Arg Arg Gly Ala Asn Phe Val Thr Arg Lys Ile Ser
215 220 225
Arg Ser Val Ala Lys Ile Tyr Leu Gly Gln Leu Glu Cys Phe Ser Leu
230 235 240
Gly Asn Leu Asp Ala Lys Arg Asp Trp Gly His Ala Lys Asp Tyr Val
245 250 255 260
Glu Ala Met Trp Leu Met Leu Gln Asn Asp Glu Pro Glu Asp Phe Val
265 270 275
Ile Ala Thr Gly Glu Val His Ser Val Arg Glu Phe Val Glu Lys Ser
280 285 290
Phe Met His Ile Gly Lys Thr Ile Val Trp Glu Gly Lys Asn Glu Asn
295 300 305
Glu Val Gly Arg Cys Lys Glu Thr Gly Lys Ile His Val Thr Val Asp

310 315 320
Leu Lys Tyr Tyr Arg Pro Thr Glu Val Asp Phe Leu Gln Gly Asp Cys
325 330 335 340
Ser Lys Ala Gln Gln Lys Leu Asn Trp Lys Pro Arg Val Ala Phe Asp
345 350 355
Glu Leu Val Arg Glu Met Val Gln Ala Asp Val Glu Leu Met Arg Thr
360 365 370
Asn Pro Asn Ala
375

<210> 72
<211> 420
<212> DNA
<213> Mus musculus

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(420)

<400> 72
atg gaa tgg atc tgg atc ttt ctc ttc ttc ctc tca gga act aca ggt 48
Met Glu Trp Ile Trp Ile Phe Leu Phe Phe Leu Ser Gly Thr Thr Gly
1 5 10 15
gtc tac tcc cag gtt cag ctg cag cag tct gga gct gag gtg gcg agg 96
Val Tyr Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Val Ala Arg
20 25 30
ccc ggg gct tca gtg aaa ctg tcc tgc aag gct tct ggc tac acc ttc 144
Pro Gly Ala Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
35 40 45
act gac tac tat cta aac tgg gtg aag cag agg tct gga cag ggc ctt 192
Thr Asp Tyr Tyr Leu Asn Trp Val Lys Gln Arg Ser Gly Gln Gly Leu
50 55 60
gag tgg att gga gag att gat cct gga agt gat agt ata tat tat aat 240
Glu Trp Ile Gly Glu Ile Asp Pro Gly Ser Asp Ser Ile Tyr Tyr Asn
65 70 75 80
gaa aac ttg gag ggc agg gcc aca ctg act gca gac aaa tcc tcc agc 288
Glu Asn Leu Glu Gly Arg Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser

85 90 95

aca gcc tac atg cag ctc aac agc ctg aca tct gag gac tct gca gtc 336
Thr Ala Tyr Met Gln Leu Asn Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val
100 105 110

tat ttc tgt gca aga tat ggg tat tct aga tac gac gta agg ttt gtc 384
Tyr Phe Cys Ala Arg Tyr Gly Tyr Ser Arg Tyr Asp Val Arg Phe Val
115 120 125

tac tgg ggc caa ggg act ctg gtc act gtc tct aca 420
Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Thr
130 135 140

<210> 73
<211> 140
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 73
Met Glu Trp Ile Trp Ile Phe Leu Phe Phe Leu Ser Gly Thr Thr Gly
1 5 10 15
Val Tyr Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Val Ala Arg
20 25 30
Pro Gly Ala Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
35 40 45
Thr Asp Tyr Tyr Leu Asn Trp Val Lys Gln Arg Ser Gly Gln Gly Leu
50 55 60
Glu Trp Ile Gly Glu Ile Asp Pro Gly Ser Asp Ser Ile Tyr Tyr Asn
65 70 75 80
Glu Asn Leu Glu Gly Arg Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser
85 90 95
Thr Ala Tyr Met Gln Leu Asn Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val
100 105 110
Tyr Phe Cys Ala Arg Tyr Gly Tyr Ser Arg Tyr Asp Val Arg Phe Val
115 120 125
Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Thr
130 135 140

<210> 74
<211> 393
<212> DNA
<213> Mus musculus

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(393)

<400> 74

```
atg aag ttg cct gtt agg ctg ttg gtg ctg atg ttc tgg att cct gct   48
Met Lys Leu Pro Val Arg Leu Leu Val Leu Met Phe Trp Ile Pro Ala
 1               5                  10                  15
tcc agg agt gat gtt ttg atg acc caa act cca ctc tcc ctg cct gtc   96
Ser Arg Ser Asp Val Leu Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val
            20                  25                  30
agt ctt gga gat caa gcc tcc atc tct tgc aga tct agt cag agt ctt  144
Ser Leu Gly Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu
        35                  40                  45
gta cat agt aat gga aga acc tat tta gaa tgg tac ctg cag aaa cct  192
Val His Ser Asn Gly Arg Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro
    50                  55                  60
ggc cag tca cca aag gtc ctg atc tac aaa gtt tcc aac cga att tct  240
Gly Gln Ser Pro Lys Val Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Ile Ser
65                  70                  75                  80
ggg gtc cca gac agg ttc agt ggc agt gga tca ggg aca gat ttc aca  288
Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
                85                  90                  95
ctc aaa atc agc aga gtg gag gct gag gat ctg gga gtt tat ttc tgc  336
Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys
            100                 105                 110
ttt cag ggt tca cat gtt ccg tac acg ttc gga ggg ggg acc aag ctg  384
Phe Gln Gly Ser His Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu
        115                 120                 125
gaa ata aaa                                                     393
Glu Ile Lys
    130
```

<210> 75
<211> 131
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 75

```
Met Lys Leu Pro Val Arg Leu Leu Val Leu Met Phe Trp Ile Pro Ala
 1               5                  10                  15
Ser Arg Ser Asp Val Leu Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val
            20                  25                  30
Ser Leu Gly Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu
        35                  40                  45
Val His Ser Asn Gly Arg Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro
    50                  55                  60
Gly Gln Ser Pro Lys Val Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Ile Ser
65                  70                  75                  80
Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
                85                  90                  95
Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys
            100                 105                 110
Phe Gln Gly Ser His Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu
        115                 120                 125
Glu Ile Lys
    130
```

<210> 76
<211> 5
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 76

```
Asp Tyr Tyr Leu Asn
 1               5
```

<210> 77

<211> 17
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 77
Glu Ile Asp Pro Gly Ser Asp Ser Ile Tyr Tyr Asn Glu Asn Leu Glu
1 5 10 15
Gly

<210> 78
<211> 12
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 78
Tyr Gly Tyr Ser Arg Tyr Asp Val Arg Phe Val Tyr
1 5 10

<210> 79
<211> 16
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 79
Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser Asn Gly Arg Thr Tyr Leu Glu
1 5 10 15

<210> 80
<211> 7
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 80
Lys Val Ser Asn Arg Ile Ser
1 5

<210> 81
<211> 9
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 81
Phe Gln Gly Ser His Val Pro Tyr Thr
1 5

<210> 82
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

<400> 82
ctgaattcgc ggccgctagt cc 22

<210> 83
<211> 39
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

<400> 83
atgggcccct ggtggaggct gtagagacag tgaccagag 39

<210> 84
<211> 22
<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

<400> 84
ctgaattcgc ggccgctgct gt 22

<210> 85
<211> 28
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

<400> 85
atcgtacgtt ttatttccag cttggtcc 28

<210> 86
<211> 57
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

<400> 86
ttgttggtac cgaattcttt cagggccccg gagccccgag agcccaaatc ttgtgac 57

<210> 87
<211> 31
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

<400> 87
gcgaattcca ccatgggcag cccccgctcc g 31

<210> 88
<211> 32
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

<400> 88
cgggatccct atcggggctc cggggcccaa gt 32

<210> 89
<211> 1341
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

<400> 89
atg ggc agc ccc cgc tcc gcg ctg agc tgc ctg ctg ttg cac ttg ctg 48
Met Gly Ser Pro Arg Ser Ala Leu Ser Cys Leu Leu Leu His Leu Leu
1 5 10 15
gtt ctc tgc ctc caa gcc cag gta act gtt cag tcc tca cct aat ttt 96
Val Leu Cys Leu Gln Ala Gln Val Thr Val Gln Ser Ser Pro Asn Phe
20 25 30
aca cag cat gtg agg gag cag agc ctg gtg acg gat cag ctc agc cgc 144
Thr Gln His Val Arg Glu Gln Ser Leu Val Thr Asp Gln Leu Ser Arg
35 40 45
cgc ctc atc cgg acc tac cag ctc tac agc cgc acc agc ggg aag cac 192
Arg Leu Ile Arg Thr Tyr Gln Leu Tyr Ser Arg Thr Ser Gly Lys His

```
     50                  55                  60
gtg cag gtc ctg gcc aac aag cgc atc aac gcc atg gca gaa gac gga   240
Val Gln Val Leu Ala Asn Lys Arg Ile Asn Ala Met Ala Glu Asp Gly
 65                  70                  75                  80
gac ccc ttc gcg aag ctc att gtg gag acc gat act ttt gga agc aga   288
Asp Pro Phe Ala Lys Leu Ile Val Glu Thr Asp Thr Phe Gly Ser Arg
                85                  90                  95
gtc cga gtt cgc ggc gca gag aca ggt ctc tac atc tgc atg aac aag   336
Val Arg Val Arg Gly Ala Glu Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Met Asn Lys
            100                 105                 110
aag ggg aag cta att gcc aag agc aac ggc aaa ggc aag gac tgc gta   384
Lys Gly Lys Leu Ile Ala Lys Ser Asn Gly Lys Gly Lys Asp Cys Val
        115                 120                 125
ttc aca gag atc gtg ctg gag aac aac tac acg gcg ctg cag aac gcc   432
Phe Thr Glu Ile Val Leu Glu Asn Asn Tyr Thr Ala Leu Gln Asn Ala
    130                 135                 140
aag tac gag ggc tgg tac atg gcc ttt acc cgc aag ggc cgg ccc cgc   480
Lys Tyr Glu Gly Trp Tyr Met Ala Phe Thr Arg Lys Gly Arg Pro Arg
145                 150                 155                 160
aag ggc tcc aag acg cgc cag cat cag cgc gag gtg cac ttc atg aag   528
Lys Gly Ser Lys Thr Arg Gln His Gln Arg Glu Val His Phe Met Lys
                165                 170                 175
cgc ctg ccg cgg ggc cac cac acc acc gag cag agc ctg cgc ttc gag   576
Arg Leu Pro Arg Gly His His Thr Thr Glu Gln Ser Leu Arg Phe Glu
            180                 185                 190
ttc ctc aac tac ccg ccc ttc acg cgc agc ctg cgc ggc agc cag agg   624
Phe Leu Asn Tyr Pro Pro Phe Thr Arg Ser Leu Arg Gly Ser Gln Arg
        195                 200                 205
act tgg gcc ccg gag ccc cga gag ccc aaa tct tgt gac aaa act cac   672
Thr Trp Ala Pro Glu Pro Arg Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His
    210                 215                 220
aca tgc cca ccg tgc cca gca cct gaa ctc ctg ggg gga ccg tca gtc   720
Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val
225                 230                 235                 240
ttc ctc ttc ccc cca aaa ccc aag gac acc ctc atg atc tcc cgg acc   768
Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
                245                 250                 255
cct gag gtc aca tgc gtg gtg gtg gac gtg agc cac gaa gac cct gag   816
```

```
Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu
            260                 265                 270
gtc aag ttc aac tgg tac gtg gac ggc gtg gag gtg cat aat gcc aag   864
Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
        275                 280                 285
aca aag ccg cgg gag gag cag tac aac agc acg tac cgt gtg gtc agc   912
Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
    290                 295                 300
gtc ctc acc gtc ctg cac cag gac tgg ctg aat ggc aag gag tac aag   960
Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
305                 310                 315                 320
tgc aag gtc tcc aac aaa gcc ctc cca gcc ccc atc gag aaa acc atc   1008
Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile
                325                 330                 335
tcc aaa gcc aaa ggg cag ccc cga gaa cca cag gtg tac acc ctg ccc   1056
Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
            340                 345                 350
cca tcc cgg gat gag ctg acc aag aac cag gtc agc ctg acc tgc ctg   1104
Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
        355                 360                 365
gtc aaa ggc ttc tat ccc agc gac atc gcc gtg gag tgg gag agc aat   1152
Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
    370                 375                 380
ggg cag ccg gag aac aac tac aag acc acg cct ccc gtg ctg gac tcc   1200
Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
385                 390                 395                 400
gac ggc tcc ttc ttc ctc tac agc aag ctc acc gtg gac aag agc agg   1248
Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
                405                 410                 415
tgg cag cag ggg aac gtc ttc tca tgc tcc gtg atg cat gag gct ctg   1296
Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
            420                 425                 430
cac aac cac tac acg cag aag agc ctc tcc ctg tct ccg ggt aaa       1341
His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
        435                 440                 445
```

<210> 90

<211> 447

<212> protein

<213> homo sapiens

<400>90

```
Met Gly Ser Pro Arg Ser Ala Leu Ser Cys Leu Leu Leu His Leu Leu
 1               5                  10                  15
Val Leu Cys Leu Gln Ala Gln Val Thr Val Gln Ser Ser Pro Asn Phe
            20                  25                  30
Thr Gln His Val Arg Glu Gln Ser Leu Val Thr Asp Gln Leu Ser Arg
        35                  40                  45
Arg Leu Ile Arg Thr Tyr Gln Leu Tyr Ser Arg Thr Ser Gly Lys His
    50                  55                  60
Val Gln Val Leu Ala Asn Lys Arg Ile Asn Ala Met Ala Glu Asp Gly
65                  70                  75                  80
Asp Pro Phe Ala Lys Leu Ile Val Glu Thr Asp Thr Phe Gly Ser Arg
                85                  90                  95
Val Arg Val Arg Gly Ala Glu Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Met Asn Lys
            100                 105                 110
Lys Gly Lys Leu Ile Ala Lys Ser Asn Gly Lys Gly Lys Asp Cys Val
        115                 120                 125
Phe Thr Glu Ile Val Leu Glu Asn Asn Tyr Thr Ala Leu Gln Asn Ala
    130                 135                 140
Lys Tyr Glu Gly Trp Tyr Met Ala Phe Thr Arg Lys Gly Arg Pro Arg
145                 150                 155                 160
Lys Gly Ser Lys Thr Arg Gln His Gln Arg Glu Val His Phe Met Lys
                165                 170                 175
Arg Leu Pro Arg Gly His His Thr Thr Glu Gln Ser Leu Arg Phe Glu
            180                 185                 190
Phe Leu Asn Tyr Pro Pro Phe Thr Arg Ser Leu Arg Gly Ser Gln Arg
        195                 200                 205
Thr Trp Ala Pro Glu Pro Arg Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His
    210                 215                 220
Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val
225                 230                 235                 240
Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
                245                 250                 255
Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu
```

260 265 270
Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
275 280 285
Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
290 295 300
Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
305 310 315 320
Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile
325 330 335
Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
340 345 350
Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
355 360 365
Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
370 375 380
Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
385 390 395 400
Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
405 410 415
Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
420 425 430
His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435 440 445

<210> 91
<211> 1245
<212> DNA
<213> Cricetulus griseus

<400> 91
gaacttcacc caagccatgt gacaattgaa ggctgtaccc ccagacccta acatcttgga 60
gccctgtaga ccagggagtg cttctggccg tggggtgacc tagctcttct accaccatga 120
acagggcccc tctgaagcgg tccaggatcc tgcgcatggc gctgactgga ggctccactg 180
cctctgagga ggcagatgaa gacagcagga acaagccgtt tctgctgcgg gcgctgcaga 240
tcgcgctggt cgtctctctc tactgggtca cctccatctc catggtattc ctcaacaagt 300
acctgctgga cagcccctcc ctgcagctgg ataccctat cttcgtcact ttctaccaat 360
gcctggtgac ctctctgctg tgcaagggcc tcagcactct ggccacctgc tgccctggca 420

ccgttgactt ccccaccctg aacctggacc ttaaggtggc ccgcagcgtg ctgccactgt 480
cggtagtctt cattggcatg ataagtttca ataacctctg cctcaagtac gtaggggtgg 540
ccttctacaa cgtggggcgc tcgctcacca ccgtgttcaa tgtgcttctg tcctacctgc 600
tgctcaaaca gaccacttcc ttctatgccc tgctcacatg tggcatcatc attggtggtt 660
tctggctggg tatagaccaa gagggagctg agggcaccct gtccctcata ggcaccatct 720
tcggggtgct ggccagcctc tgcgtctccc tcaatgccat ctataccaag aaggtgctcc 780
cagcagtgga caacagcatc tggcgcctaa ccttctataa caatgtcaat gcctgtgtgc 840
tcttcttgcc cctgatggtt ctgctgggtg agctccgtgc cctccttgac tttgctcatc 900
tgtacagtgc ccacttctgg ctcatgatga cgctgggtgg cctcttcggc tttgccattg 960
gctatgtgac aggactgcag atcaaattca ccagtccccc gacccacaat gtatcaggca 1020
cagccaaggc ctgtgcgcag acagtgctgg ccgtgctcta ctatgaagag actaagagct 1080
tcctgtggtg gacaagcaac ctgatggtgc tgggtggctc ctcagcctat acctgggtca 1140
ggggctggga gatgcagaag acccaagagg accccagctc caaagagggt gagaagagtg 1200
ctattggggt gtgagcttct tcagggacct gggactgaac ccaag 1245

<210> 92
<211> 365
<212> PRT
<213> Cricetulus griseus

<400> 92

Met	Asn	Arg	Ala	Pro	Leu	Lys	Arg	Ser	Arg	Ile	Leu	Arg	Met	Ala	Leu
1				5				10						15	
Thr	Gly	Gly	Ser	Thr	Ala	Ser	Glu	Glu	Ala	Asp	Glu	Asp	Ser	Arg	Asn
			20					25				30			
Lys	Pro	Phe	Leu	Leu	Arg	Ala	Leu	Gln	Ile	Ala	Leu	Val	Val	Ser	Leu
		35					40					45			
Tyr	Trp	Val	Thr	Ser	Ile	Ser	Met	Val	Phe	Leu	Asn	Lys	Tyr	Leu	Leu
	50					55					60				
Asp	Ser	Pro	Ser	Leu	Gln	Leu	Asp	Thr	Pro	Ile	Phe	Val	Thr	Phe	Tyr
65					70					75					80
Gln	Cys	Leu	Val	Thr	Ser	Leu	Leu	Cys	Lys	Gly	Leu	Ser	Thr	Leu	Ala
				85					90					95	
Thr	Cys	Cys	Pro	Gly	Thr	Val	Asp	Phe	Pro	Thr	Leu	Asn	Leu	Asp	Leu
			100					105				110			
Lys	Val	Ala	Arg	Ser	Val	Leu	Pro	Leu	Ser	Val	Val	Phe	Ile	Gly	Met
		115					120					125			

Ile Ser Phe Asn Asn Leu Cys Leu Lys Tyr Val Gly Val Ala Phe Tyr
130 135 140
Asn Val Gly Arg Ser Leu Thr Thr Val Phe Asn Val Leu Leu Ser Tyr
145 150 155 160
Leu Leu Leu Lys Gln Thr Thr Ser Phe Tyr Ala Leu Leu Thr Cys Gly
165 170 175
Ile Ile Ile Gly Gly Phe Trp Leu Gly Ile Asp Gln Glu Gly Ala Glu
180 185 190
Gly Thr Leu Ser Leu Ile Gly Thr Ile Phe Gly Val Leu Ala Ser Leu
195 200 205
Cys Val Ser Leu Asn Ala Ile Tyr Thr Lys Lys Val Leu Pro Ala Val
210 215 220
Asp Asn Ser Ile Trp Arg Leu Thr Phe Tyr Asn Asn Val Asn Ala Cys
225 230 235 240
Val Leu Phe Leu Pro Leu Met Val Leu Leu Gly Glu Leu Arg Ala Leu
245 250 255
Leu Asp Phe Ala His Leu Tyr Ser Ala His Phe Trp Leu Met Met Thr
260 265 270
Leu Gly Gly Leu Phe Gly Phe Ala Ile Gly Tyr Val Thr Gly Leu Gln
275 280 285
Ile Lys Phe Thr Ser Pro Leu Thr His Asn Val Ser Gly Thr Ala Lys
290 295 300
Ala Cys Ala Gln Thr Val Leu Ala Val Leu Tyr Tyr Glu Glu Thr Lys
305 310 315 320
Ser Phe Leu Trp Trp Thr Ser Asn Leu Met Val Leu Gly Gly Ser Ser
325 330 335
Ala Tyr Thr Trp Val Arg Gly Trp Glu Met Gln Lys Thr Gln Glu Asp
340 345 350
Pro Ser Ser Lys Glu Gly Glu Lys Ser Ala Ile Gly Val
355 360 365

<210> 93
<211> 1095
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 93

atgaataggg cccctctgaa gcggtccagg atcctgcaca tggcgctgac cggggcctca 60
gacccctctg cagaggcaga ggccaacggg gagaagcccc ttctgctgcg ggcattgcag 120
atcgcgctgg tggtctcccc ctactgggtc acctccatct ccatggtgtt ccttaataag 180
tacctgctgg acagcccctc cctgcggctg gacaccccca tcttcgtcac cttctaccag 240
tgcctggtga ccacgctgct gtgcaaaggc ctcagcgctc tggccgcctg ctgccctggt 300
gccgtggact tccccagctt gcgcctggac ctcagggtgg cccgcagcgt cctgcccctg 360
tcggtggtct tcatcggcat gatcaccttc aataacctct gcctcaagta cgtcggtgtg 420
gccttctaca atgtgggccg ctcactcacc accgtcttca acgtgctgct ctcctacctg 480
ctgctcaagc agaccacctc cttctatgcc ctgctcacct gcggtatcat catcgggggc 540
ttctggcttg gtgtggacca ggaggggca gaaggcaccc tgtcgtggct gggcaccgtc 600
ttcggcgtgc tggctagcct ctgtgtctcg ctcaacgcca tctacaccac gaaggtgctc 660
ccggcggtgg acggcagcat ctggcgcctg actttctaca acaacgtcaa cgcctgcatc 720
ctcttcctgc ccctgctcct gctgctcggg gagcttcagg ccctgcgtga ctttgcccag 780
ctgggcagtg cccacttctg ggggatgatg acgctgggcg gcctgtttgg ctttgccatc 840
ggctacgtga caggactgca gatcaagttc accagtccgc tgacccacaa tgtgtcgggc 900
acggccaagg cctgtgccca gacagtgctg gccgtgctct actacgagga gaccaagagc 960
ttcctctggt ggacgagcaa catgatggtg ctgggcggct cctccgccta cacctgggtc 1020
aggggctggg agatgaagaa gactccggag gagcccagcc ccaaagacag cgagaagagc 1080
gccatggggg tgtga 1095

<210> 94
<211> 364
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 94

Met Asn Arg Ala Pro Leu Lys Arg Ser Arg Ile Leu His Met Ala Leu
1 5 10 15
Thr Gly Ala Ser Asp Pro Ser Ala Glu Ala Glu Ala Asn Gly Glu Lys
20 25 30
Pro Phe Leu Leu Arg Ala Leu Gln Ile Ala Leu Val Val Ser Leu Tyr
35 40 45
Trp Val Thr Ser Ile Ser Met Val Phe Leu Asn Lys Tyr Leu Leu Asp
50 55 60
Ser Pro Ser Leu Arg Leu Asp Thr Pro Ile Phe Val Thr Phe Tyr Gln
65 70 75 80
Cys Leu Val Thr Thr Leu Leu Cys Lys Gly Leu Ser Ala Leu Ala Ala

85 90 95

Cys Cys Pro Gly Ala Val Asp Phe Pro Ser Leu Arg Leu Asp Leu Arg
100 105 110

Val Ala Arg Ser Val Leu Pro Leu Ser Val Val Phe Ile Gly Met Ile
115 120 125

Thr Phe Asn Asn Leu Cys Leu Lys Tyr Val Gly Val Ala Phe Tyr Asn
130 135 140

Val Gly Arg Ser Leu Thr Thr Val Phe Asn Val Leu Leu Ser Tyr Leu
145 150 155 160

Leu Leu Lys Gln Thr Thr Ser Phe Tyr Ala Leu Leu Thr Cys Gly Ile
165 170 175

Ile Ile Gly Gly Phe Trp Leu Gly Val Asp Gln Glu Gly Ala Glu Gly
180 185 190

Thr Leu Ser Trp Leu Gly Thr Val Phe Gly Val Leu Ala Ser Leu Cys
195 200 205

Val Ser Leu Asn Ala Ile Tyr Thr Thr Lys Val Leu Pro Ala Val Asp
210 215 220

Gly Ser Ile Trp Arg Leu Thr Phe Tyr Asn Asn Val Asn Ala Cys Ile
225 230 235 240

Leu Phe Leu Pro Leu Leu Leu Leu Leu Gly Glu Leu Gln Ala Leu Arg
245 250 255

Asp Phe Ala Gln Leu Gly Ser Ala His Phe Trp Gly Met Met Thr Leu
260 265 270

Gly Gly Leu Phe Gly Phe Ala Ile Gly Tyr Val Thr Gly Leu Gln Ile
275 280 285

Lys Phe Thr Ser Pro Leu Thr His Asn Val Ser Gly Thr Ala Lys Ala
290 295 300

Cys Ala Gln Thr Val Leu Ala Val Leu Tyr Tyr Glu Glu Thr Lys Ser
305 310 315 320

Phe Leu Trp Trp Thr Ser Asn Met Met Val Leu Gly Gly Ser Ser Ala
325 330 335

Tyr Thr Trp Val Arg Gly Trp Glu Met Lys Lys Thr Pro Glu Glu Pro
340 345 350

Ser Pro Lys Asp Ser Glu Lys Ser Ala Met Gly Val
355 360 364

<210> 95

<211> 2609

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 95

gagccgaggg tggtgctgca ggtgcacccg agggcaccgc cgagggtgag caccaggtcc 60
ctgcatcagc caggacacca gagcccagtc gggtggacgg acgggcgcct ctgaagcggt 120
ccaggatcct gcgcatggcg ctgactggag tctctgctgt ctccgaggag tcagagagcg 180
ggaacaagcc atttctgctc cgggctctgc agatcgcgct ggtggtctct ctctactggg 240
tcacctccat ttccatggta ttcctcaaca agtacctgct ggacagcccc tccctgcagc 300
tggatacccc catttttgtc accttctacc aatgcctggt gacctcactg ctgtgcaagg 360
gcctcagcac tctggccacc tgctgccccg gcatggtaga cttccccacc ctaaacctgg 420
acctcaaggt ggcccgaagt gtgctgccgc tgtcagtggt ctttatcggc atgataacct 480
tcaataacct ctgcctcaag tacgtagggg tgcccttcta caacgtggga cgctcgctca 540
ccaccgtgtt caacgttctt ctctcctacc tgctgctcaa acagaccact tccttctatg 600
ccctgctcac ctgcggcgtc atcattggtg gtttctggct gggtatagac caagaaggag 660
ctgagggaac cttgtccctg acgggcacca tcttcggggt gctggccagc ctctgcgtct 720
ccctcaatgc catctatacc aagaaggtgc tccctgcagt agaccacagt atctggcgcc 780
taaccttcta taacaatgtc aatgcctgcg tgctcttctt gcccctgatg atagtgctgg 840
gcgagctccg tgccctcctg gccttcactc atctgagcag tgcccacttc tggctcatga 900
tgacgctggg tggcctgttt ggctttgcca tcggctatgt gacaggactg cagatcaaat 960
tcaccagtcc cctgacccat aacgtgtcag gcacggccaa ggcctgtgca cagacagtgc 1020
tggccgtgct ctactacgaa gagattaaga gcttcctgtg gtggacaagc aacctgatgg 1080
tgctgggtgg ctcctccgcc tacacctggg tcaggggctg ggagatgcag aagacccagg 1140
aggaccccag ctccaaagat ggtgagaaga gtgctatcag ggtgtgagct ccttcaggga 1200
gccagggctg agctcgggtg gggcctgccc agcacggaag gcttcccata gagcctactg 1260
ggtatggccc tgagcaataa tgtttacatc cttctcagaa gaccatctaa gaagagccag 1320
gttctttcct gataatgtca gaaagctgcc aaatctcctg cctgccccat cttctagtct 1380
tgggaaagcc ctaccaggag tggcaccctt cctgcctcct cctggggcct gtctacctcc 1440
atatggtctc tggggttggg gccagctgca ctctttgggc actggactga tgaagtgatg 1500
tcttactttc tacacaaggg agatgggttg tgaccctact atagctagtt gaagggagct 1560
gtgtaacccc acatctctgg ggccctgggc aggtagcata atagctaggt gctattaaca 1620
tcaataacac ttcagactac ctttggaggc agttgggagc tgagccgaga gagagagatg 1680
gccattctgc cctcttctgt gtggatgggt atgacagacc aactgtccat ggggtgactg 1740
acacctccac acttcatatt ttcaacttta gaaaaggggg agccacacgt tttacagatt 1800
aagtggagtg atgaatgcct ctacagcccc taaccccact ttccctgcct ggcttctctt 1860
ggcccagaag ggccaccatc ctgttctcca acacctgacc cagctatctg gctatactct 1920
ctttctgtac tcccttcccc ttcccccccc cattagcctc ctccccaaca cctccatctt 1980

caggcaggaa gtggggtcca ctcagcctct gttcccatct gcttggaccc ctgagcctct 2040
catgaaggta ggcttatgtt ctctgaggct ggggccggag gagcgcactg attctcggag 2100
ttatcccatc aggctcctgt cacaaaatag cctaggccgt gtgtctaaga acagtggagg 2160
ttggcttata actgttctgg gggcagcgaa gcccacatca aggtactcat agacccagta 2220
tttctgagga aacccctgtc cacatcctca cttggtaaag gcacagataa tctccctcag 2280
gcctcttgta taggagcact agccctggga gggctccgcc ccatgacctg atcaccccaa 2340
agccttcaac agaaggattc caacatgaat ttggggacag aagcactcag accacgatgc 2400
ccagcaccac accctcctat cctcagggta gctgtcactg tcctagtccc ttctgtttgg 2460
ccttttgtac cctcatttcc ttggcgtcat gtttgatgtc tttgtctctt tcgtgagaag 2520
atggggaaac catgtcagcc tctgcttccg acttcccatg ggttctaatg aagttggtgg 2580
ggcctgatgc cctgagttgt atgtgattt 2609

<210> 96
<211> 360
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 96

Met	Ala	Leu	Thr	Gly	Val	Ser	Ala	Val	Ser	Glu	Glu	Ser	Glu	Ser	Gly
1				5				10					15		
Asn	Lys	Pro	Phe	Leu	Leu	Arg	Ala	Leu	Gln	Ile	Ala	Leu	Val	Val	Ser
			20					25				30			
Leu	Tyr	Trp	Val	Thr	Ser	Ile	Ser	Met	Val	Phe	Leu	Asn	Lys	Tyr	Leu
		35					40					45			
Leu	Asp	Ser	Pro	Ser	Leu	Gln	Leu	Asp	Thr	Pro	Ile	Phe	Val	Thr	Phe
	50					55					60				
Tyr	Gln	Cys	Leu	Val	Thr	Ser	Leu	Leu	Cys	Lys	Gly	Leu	Ser	Thr	Leu
65					70					75					80
Ala	Thr	Cys	Cys	Pro	Gly	Met	Val	Asp	Phe	Pro	Thr	Leu	Asn	Leu	Asp
				85					90					95	
Leu	Lys	Val	Ala	Arg	Ser	Val	Leu	Pro	Leu	Ser	Val	Val	Phe	Ile	Gly
			100					105					110		
Met	Ile	Thr	Phe	Asn	Asn	Leu	Cys	Leu	Lys	Tyr	Val	Gly	Val	Pro	Phe
		115					120					125			
Tyr	Asn	Val	Gly	Arg	Ser	Leu	Thr	Thr	Val	Phe	Asn	Val	Leu	Leu	Ser
	130					135					140				
Tyr	Leu	Leu	Leu	Lys	Gln	Thr	Thr	Ser	Phe	Tyr	Ala	Leu	Leu	Thr	Cys

145 150 155 160
Gly Val Ile Ile Gly Gly Phe Trp Leu Gly Ile Asp Gln Glu Gly Ala
165 170 175
Glu Gly Thr Leu Ser Leu Thr Gly Thr Ile Phe Gly Val Leu Ala Ser
180 185 190
Leu Cys Val Ser Leu Asn Ala Ile Tyr Thr Lys Lys Val Leu Pro Ala
195 200 205
Val Asp His Ser Ile Trp Arg Leu Thr Phe Tyr Asn Asn Val Asn Ala
210 215 220
Cys Val Leu Phe Leu Pro Leu Met Ile Val Leu Gly Glu Leu Arg Ala
225 230 235 240
Leu Leu Ala Phe Thr His Leu Ser Ser Ala His Phe Trp Leu Met Met
245 250 255
Thr Leu Gly Gly Leu Phe Gly Phe Ala Ile Gly Tyr Val Thr Gly Leu
260 265 270
Gln Ile Lys Phe Thr Ser Pro Leu Thr His Asn Val Ser Gly Thr Ala
275 280 285
Lys Ala Cys Ala Gln Thr Val Leu Ala Val Leu Tyr Tyr Glu Glu Ile
290 295 300
Lys Ser Phe Leu Trp Trp Thr Ser Asn Leu Met Val Leu Gly Gly Ser
305 310 315 320
Ser Ala Tyr Thr Trp Val Arg Gly Trp Glu Met Gln Lys Thr Gln Glu
325 330 335
Asp Pro Ser Ser Lys Asp Gly Glu Lys Ser Ala Ile Arg Val
340 345 350

<210> 97
<211> 1053
<212> DNA
<213> Rattus norvegiucus

<400> 97
atggcgctga ctggagcctc tgctgtctct gaggaggcag acagcgagaa caagccattt 60
ctgctacggg ctctgcagat cgcgctggtg gtttctctct actgggtcac ctccatctcc 120
atggtattcc tcaacaagta cctgctggac agcccctccc tgcagctgga tacccccatc 180
ttcgtcacct tctaccaatg cctggtgacc tcactgctgt gcaagggcct cagcactctg 240
gccacctgct gccctggcat ggtagacttc cccaccctaa acctggacct caaggtggcc 300

cgaagtgtgc tgccgctgtc cgtggtcttt atcggcatga taaccttcaa taacctctgc 360
ctcaagtacg tgggggtggc cttctacaac gtgggacgct cgctcactac cgtgttcaat 420
gtgcttctct cctacctgct gcttaaacag accacttcct tttatgccct gctcacctgt 480
gccatcatca ttggtggttt ctggctggga atagatcaag agggagctga gggcaccctg 540
tccctgacgg gcaccatctt cggggtgctg gccagcctct gtgtctcact caatgccatc 600
tacaccaaga aggtgctccc tgccgtagac cacagtatct ggcgcctaac cttctataac 660
aacgtcaacg cctgtgtgct cttcttgccc ctgatggtag tgctgggcga gctccatgct 720
ctcctggcct tcgctcatct gaacagcgcc cacttctggg tcatgatgac gctgggtgga 780
ctcttcggct ttgccattgg ctatgtgaca ggactgcaga tcaaattcac cagtcccctg 840
acccataatg tgtcgggcac agccaaggcc tgtgcacaga cagtgctggc tgtgctctac 900
tatgaagaga ttaagagctt cctgtggtgg acaagcaact tgatggtgct gggtggctcc 960
tctgcctaca cctgggtcag gggctgggag atgcagaaga cccaggagga ccccagctcc 1020
aaagagggtg agaagagtgc tatcggggtg tga 1053

<210> 98
<211> 350
<212> PRT
<213> Rattus norvegiucus

<400> 98
Met Ala Leu Thr Gly Ala Ser Ala Val Ser Glu Glu Ala Asp Ser Glu
1 5 10 15
Asn Lys Pro Phe Leu Leu Arg Ala Leu Gln Ile Ala Leu Val Val Ser
20 25 30
Leu Tyr Trp Val Thr Ser Ile Ser Met Val Phe Leu Asn Lys Tyr Leu
35 40 45
Leu Asp Ser Pro Ser Leu Gln Leu Asp Thr Pro Ile Phe Val Thr Phe
50 55 60
Tyr Gln Cys Leu Val Thr Ser Leu Leu Cys Lys Gly Leu Ser Thr Leu
65 70 75 80
Ala Thr Cys Cys Pro Gly Met Val Asp Phe Pro Thr Leu Asn Leu Asp
85 90 95
Leu Lys Val Ala Arg Ser Val Leu Pro Leu Ser Val Val Phe Ile Gly
100 105 110
Met Ile Thr Phe Asn Asn Leu Cys Leu Lys Tyr Val Gly Val Ala Phe
115 120 125
Tyr Asn Val Gly Arg Ser Leu Thr Thr Val Phe Asn Val Leu Leu Ser

130 135 140

Tyr Leu Leu Leu Lys Gln Thr Thr Ser Phe Tyr Ala Leu Leu Thr Cys
145 150 155 160
Ala Ile Ile Ile Gly Gly Phe Trp Leu Gly Ile Asp Gln Glu Gly Ala
165 170 175
Glu Gly Thr Leu Ser Leu Thr Gly Thr Ile Phe Gly Val Leu Ala Ser
180 185 190
Leu Cys Val Ser Leu Asn Ala Ile Tyr Thr Lys Lys Val Leu Pro Ala
195 200 205
Val Asp His Ser Ile Trp Arg Leu Thr Phe Tyr Asn Asn Val Asn Ala
210 215 220
Cys Val Leu Phe Leu Pro Leu Met Val Val Leu Gly Glu Leu His Ala
225 230 235 240
Leu Leu Ala Phe Ala His Leu Asn Ser Ala His Phe Trp Val Met Met
245 250 255
Thr Leu Gly Gly Leu Phe Gly Phe Ala Ile Gly Tyr Val Thr Gly Leu
260 265 270
Gln Ile Lys Phe Thr Ser Pro Leu Thr His Asn Val Ser Gly Thr Ala
275 280 285
Lys Ala Cys Ala Gln Thr Val Leu Ala Val Leu Tyr Tyr Glu Glu Ile
290 295 300
Lys Ser Phe Leu Trp Trp Thr Ser Asn Leu Met Val Leu Gly Gly Ser
305 310 315 320
Ser Ala Tyr Thr Trp Val Arg Gly Trp Glu Met Gln Lys Thr Gln Glu
325 330 335
Asp Pro Ser Ser Lys Glu Gly Glu Lys Ser Ala Ile Gly Val
340 345 350

<210> 99
<211> 7752
<212> DNA
<213> Mus musculus

<400> 99
agcgttgcaa gttcagccga gggtggtgct gcaggtgcac ccgagggcac cgccgagggt 60
gagcaccagg tccctgcatc agccaggaca ccagagccca gtcgggtgga cggacggtac 120
gttctggaag ggaaagggcc ccgggaaggg gatacagcat tgagaagctc agaggctttg 180

gtctgggcat ccagaatgga ctttatctgg aggaggtgac atggcttctc gcctctggaa 240
gtgctgcttg gatctccggg acttcatgtc ctgactaggt ctggaagcgg tgaaaatagg 300
ggtaggaaaa aaggagagga ctgcaacaag gtcttcccga gtggcctgag ctcgagggac 360
gagggaggtg caacggtggg gagccgggcg caagggctgg gcggagggag gggggggtc 420
tccctaagca gaaaggtggt attccatttt ctgggtagat ggtgaagatg cacctgaccg 480
agtctggtcg atctgaagat atcaggggaa aagatagtgc gggtggaggg gagaatgaca 540
gaaccttcca gaaaatggga gaggctatag cacttgcaaa cccttccctg atctccgggg 600
actcccggaa gaagagggca ggtctgtggg cataggtgca gacttgccgg ggagctcttg 660
acggccgcgg gaagtggcaa cggcctgcga gctggccctt taaggcggct cgtaggcgtg 720
tcaggaaatg cgcgcagggc ccgccctgct cggtaagtgg cccgggaccc gcgtcgctga 780
gccggaactt gaattcggct cgtggcaacc gcagggcctt gctccggtca ggcccctgtc 840
cgtgtccctc gagacgcctt cctgagcctc ggtgatctcc ctgcagcacg ccctcctttc 900
ggctctgcgg gtgcttccgg gggttcccgc agcccatgct tcccacgcgg tccgcgtcca 960
gttatttcct cctccgctcc gtccttcctt cgctctctcg cttcctttct ccctgcgact 1020
cacgtgtccc ctgtcctcaa actggccatg gctgtcaaag cccacatcct tagttaggcc 1080
ccttctccct tccctgggtc ttgtttcgtg acaccacctc cctccccccgc cccgggagcg 1140
agcaagatga ggagcggtgc acctcggcaa atccggaagc agaacttcat ccaagaagga 1200
ggggaccgat aggtcatccc atgtgacagt tgaaggctgc agccacagac cctagctgct 1260
tgaagccctg tagtccaggg actgcttctg gccgtaaggt gacccagctc ttctgccacc 1320
atgaacaggg cgcctctgaa gcggtccagg atcctgcgca tggcgctgac tggagtctct 1380
gctgtctccg aggagtcaga gagcgggaac aagccatttc tgctccgggc tctgcagatc 1440
gcgctggtgg tctctctcta ctgggtcacc tccatttcca tggtattcct caacaagtac 1500
ctgctggaca gcccctccct gcagctggat acccccattt ttgtcacctt ctaccaatgc 1560
ctggtgacct cactgctgtg caagggcctc agcactctgg ccacctgctg ccccggcatg 1620
gtagacttcc ccaccctaaa cctggacctc aaggtggccc gaagtgtgct gccgctgtca 1680
gtggtcttta tcggcatgat aaccttcaat aacctctgcc tcaagtacgt aggggtgccc 1740
ttctacaacg tgggacgctc gctcaccacc gtgttcaacg ttcttctctc ctacctgctg 1800
ctcaaacaga ccacttcctt ctatgccctg ctcacctgcg gcgtcatcat tggtgagtgg 1860
gactgggggc gtggggagca ggaatcgtaa agatcaatac cacattactc attatctgtc 1920
ccaggtcttt tgcaccacca gtcataggga gagacctgta gagaacaaat aacttcctta 1980
ctgtgactca gtaagttagg gatccagcca aggtgaacat aataatgtta ggcagacact 2040
acagcaaagc cagccagaca ctcagatcta gctaagcatt tgagccatgt taatgtaacg 2100
gatccccatt acaaggtata atatagctgc gttttatgga gagaaaccca aggcacagag 2160
aagctaagta gctgggatca cacaggtaat cactgacgta gcagaaattt gcacataagc 2220
agttacctcc ataggttaca ctcttgacca acacaccact gttctcaaga ggtcaagggt 2280
gaactcaggt catcacaatt ggcacaagta cctctaccca ctgagccatt tcagtggtcc 2340
agtcaatatg tgtgtgcttt aagaggcttt aactaccttc tcagatgtga ccataagtaa 2400
ttaattaccg ataggagcgt tgtgctgatc attacacttg tagcatcctc tttattgtac 2460

ccataagctc tctgagtggc ggcatctctg tgaaactgca gctcggagag gctgcgctcc 2520
ttgccacagc cccacaacta agaagcagat agtctgggac gcagtcccca gttggtcata 2580
ctccctggcc tgtgtttcaa gccagtctgc tttgctcctg acccttggga gttagcgcaa 2640
tgaaaaccaa cactatcact acagtctaaa tgtgctttta aatgaaagcc caggaacttt 2700
gaagcatccg gccccttaac ggcagccact atgtcctgat tccgccaaca tcttttcagt 2760
gcccggcagt cacatggagc aagggcctct tggcttggac agcatgtgtt agggaacatg 2820
tttgccactt tgaatgaatt tagtggctgc tgggttacag agaccagggc atctttcccc 2880
tcagagtcct gaatgaacga aaagcaacct tcatttgtac ctgctctgga ttttagttcg 2940
tcttgtttgg cctatttaga tgtccctggt gtctctgagg cccaggctgg gtgctctaga 3000
tgtagggacc aggccaacct gtactgtctt ccctagaaac attgccctgg ttgggcagct 3060
cctggatcca gggttaaggg gtctgggcgg agagaggtca gatagtggca ggatgcctcc 3120
cactgccccc acatacatac cctaagagat ctggtactcc tccttccagc ctacaagcta 3180
ccgtggggtc ccacttcagt ccaccagccc tgccaacgtt agaggggatg ggcctcctag 3240
taggagaact tacatgcagg aaggtacagt ctctggagaa cctgagcccg ggtccccaaa 3300
gggacaagta gctgatagtg aggcagctga gccccatggc ggcctgccca agtggcacgg 3360
gaaagtggag ctctctgctg cccccactac tggccccatc tcttggctct ccctccctt 3420
cctcctgtgg agaaggccca tctctggaaa ggcctcctag acatgcggca ctttgcaaag 3480
cctgtcgggc tcacagcccc tctagggtct aggaccttga gaatgaagaa tggagtcact 3540
tctagactct agtggtaacc accaggaggt acagggtgct ctgactgtgc agggaaaccc 3600
accgtgggct ctgctgagcc aagtgcctgt gaggctggag agtctggtgc ccttgttctg 3660
agatagcatc ttgctatgtt gccctcaagt cccaggcaac tggggctgca ggagcaccac 3720
cttgcctctc tccagcttct tgaagacttg taccttttctc ctagcagtct ctatctgctc 3780
tcactccatc cattgagcag ctattagctt gtggccaagt attttccagg ccctgtactg 3840
agttttaggg tacaagtttg agaaaggaag ggtggggtcc ttgctcctgg tccgtgaatg 3900
atgttgatgg cagaaacgat agttacacta gatgctaagg gctgtgggta tctagaggga 3960
gcagggagca tgtgggataa cctgagcagg cctagctgaa aagtcattgc tggcatgaga 4020
ctgctccagt agtacaggct gggaacacac atttgaatgt ttcctgaaga cagttgggag 4080
ccacaggaaa tatccactgt agaaagatta tttagttgta agacagagta gtagattggt 4140
taacatagta gcaaaaacgt ggccccagtt tttacagatg aagggaattg gaactcagag 4200
aggttaagta acttctccca agcagctcag ctacaaaaat cacagaacag gcaggggcct 4260
gatggctctg atgcctgtgc tggtcccact attccatgtt gctaattcct gcagcagcag 4320
taaacctctg ccttgtggaa atgaggagtc taaataaaga gaccatagca ttgccacaag 4380
caggtttcta ccaactgggg gtggcaagga atgctgtgtt agcagcagga agctgggaag 4440
aggctgagta ctgggggggat gaggaaggga tccccaggag aggctgactt tggccttgaa 4500
gaatggtgga gtccctggaa agatgcagat acacagagct ctgtggatat acagagaagt 4560
ggggagctaa gtaggtggct tggggccatc atgtgacaga ggaagtcggg ctagatgcag 4620
gaagccccggt gctgtggcct agggagccat gtaggttctt tgagcagggg gcgggggggg 4680
gggggggtga cccaggagtg actgtaaaca acatcaggcc atgagcagct ctgacctaat 4740

gttctcacca agggagccag aaccaaggct tagagccctg tccctttta gtgtccaagg 4800
tcactttact ggccctcttc ctttacagct gttggccccc acaggccatc aggcacctat 4860
gctattttat tttatagcct tcattacaat gactacaatt gtaattagag agttgacagg 4920
gtcacatctg tccttatata ttccccctct gctaagttct gcctgggaga atgtggaggg 4980
tattggtgaa atttggggaa gttataaccc ccccacccct gcccccaccc cctgctttgc 5040
tcccttatc tgcagggcat ttctgtgccc actttagccc atatagctcc caaataaatg 5100
acacagaaac ctggtatttt cattaacaaa ctgctggcac tctgctgggc aggttctgag 5160
ctgttctaac cctctaagct gctaatgccc agatagatgc cccaatgctt gccatccgag 5220
tctttctctg gcttgctctg ctccatgtgt gacctcatgg tgaatcctcc tgatttcccc 5280
acatggcctc tccacacttt tccttctccc ctctctctac cagggaccct ctcactggga 5340
cccgatgtcc catctgtact gtcctctccc acccagtcat aggctgattg agtctttatt 5400
aaccaatcag agatgatgga aaaacagttt ttacatagca ctgaggatgg agatgcttga 5460
cccttgagat gcttgcccgt aacctgtact gtatccagat gtctgggccc ccaaatcagc 5520
aggtgaatac acagtacaca ggactgaccc ccaacagagg gggaacacag gttctcactc 5580
tgggctccac gccctcggcc ctttcttagt gcaggggtta gactttgtat gtgttgatga 5640
tgaggtaagg gccatggaac agtcagaacg gtggtgtcag aatcctgtcc ctctccctcc 5700
tgtcctcatc cctccttacc gtgtcactct tctgtctgtt gcaggtggtt tctggctggg 5760
tatagaccaa gaaggagctg agggaacctt gtccctgacg ggcaccatct tcggggtgct 5820
ggccagcctc tgcgtctccc tcaatgccat ctataccaag aaggtgctcc ctgcagtaga 5880
ccacagtatc tggcgcctaa ccttctataa caatgtcaat gcctgcgtgc tcttcttgcc 5940
cctgatgata gtgctgggcg agctccgtgc cctcctggcc ttcactcatc tgagcagtgc 6000
ccacttctgg ctcatgatga cgctgggtgg cctgtttggc tttgccatcg gctatgtgac 6060
aggactgcag atcaaattca ccagtccccc gacccataac gtgtcaggca cggccaaggc 6120
ctgtgcacag acagtgctgg ccgtgctcta ctacgaagag attaagagct tcctgtggtg 6180
gacaagcaac ctgatggtgc tgggtggctc ctccgcctac acctgggtca ggggctggga 6240
gatgcagaag acccaggagg accccagctc caaagatggt gagaagagtg ctatcagggt 6300
gtgagctcct tcagggagcc agggctgagc tcgggtgggg cctgcccagc acggaaggct 6360
tcccatagag cctactgggt atggccctga gcaataatgt ttacatcctt ctcagaagac 6420
catctaagaa gagccaggtt ctttcctgat aatgtcagaa agctgccaaa tctcctgcct 6480
gccccatctt ctagtcttgg gaaagcccta ccaggagtgg cacccttcct gcctcctcct 6540
ggggcctgtc tacctccata tggtctctgg ggttggggcc agctgcactc tttgggcact 6600
ggactgatga agtgatgtct tactttctac acaagggaga tgggttgtga ccctactata 6660
gctagttgaa gggagctgtg taaccccaca tctctggggc cctgggcagg tagcataata 6720
gctaggtgct attaacatca ataacacttc agactacctt tggaggcagt tgggagctga 6780
gccgagagag agagatggcc attctgccct cttctgtgtg gatgggtatg acagaccaac 6840
tgtccatggg gtgactgaca cctccacact tcatattttc aactttagaa aaggggagc 6900
cacacgtttt acagattaag tggagtgatg aatgcctcta cagcccctaa ccccactttc 6960
cctgcctggc ttctcttggc ccagaagggc caccatcctg ttctccaaca cctgacccag 7020

ctatctggct atactctctt tctgtactcc cttccccttc cccccccccat tagcctcctc 7080
cccaacacct ccatcttcag gcaggaagtg gggtccactc agcctctgtt cccatctgct 7140
tggacccctg agcctctcat gaaggtaggc ttatgttctc tgaggctggg gccggaggag 7200
cgcactgatt ctcggagtta tcccatcagg ctcctgtcac aaaatagcct aggccgtgtg 7260
tctaagaaca gtggaggttg gcttataact gttctggggg cagcgaagcc cacatcaagg 7320
tactcataga cccagtattt ctgaggaaac ccctgtccac atcctcactt ggtaaaggca 7380
cagataatct ccctcaggcc tcttgtatag gagcactagc cctgggaggg ctccgccccа 7440
tgacctgatc accccaaagc cttcaacaga aggattccaa catgaatttg gggacagaag 7500
cactcagacc acgatgccca gcaccacacc ctcctatcct cagggtagct gtcactgtcc 7560
tagtcccttc tgtttggcct tttgtaccct catttccttg gcgtcatgtt tgatgtcttt 7620
gtctctttcg tgagaagatg gggaaaccat gtcagcctct gcttccgact tcccatgggt 7680
tctaatgaag ttggtggggc ctgatgccct gagttgtatg tgatttaata aaaaaaaaat 7740
ttttttaaaa ac 7752

<210> 100
<211> 4039
<212> DNA
<213> Cricetulus griseus

<400> 100
gaacttcacc caagccatgt gacaattgaa ggctgtaccc ccagacccta acatcttgga 60
gccctgtaga ccagggagtg cttctggccg tggggtgacc tagctcttct accaccatga 120
acagggcccc tctgaagcgg tccaggatcc tgcgcatggc gctgactgga ggctccactg 180
cctctgagga ggcagatgaa gacagcagga acaagccgtt tctgctgcgg gcgctgcaga 240
tcgcgctggt cgtctctctc tactgggtca cctccatctc catggtattc ctcaacaagt 300
acctgctgga cagcccctcc ctgcagctgg atacccctat cttcgtcact ttctaccaat 360
gcctggtgac ctctctgctg tgcaagggcc tcagcactct ggccacctgc tgccctggca 420
ccgttgactt ccccaccctg aacctggacc ttaaggtggc ccgcagcgtg ctgccactgt 480
cggtagtctt cattggcatg ataagtttca ataacctctg cctcaagtac gtaggggtgg 540
ccttctacaa cgtggggcgc tcgctcacca ccgtgttcaa tgtgcttctg tcctacctgc 600
tgctcaaaca gaccacttcc ttctatgccc tgctcacatg tggcatcatc attggtgagt 660
ggggcccggg ggctgtggga gcaggatggg catcgaactg aagccctaaa ggtcaacact 720
gtaggtacct ttacttactg tcccaggtcc cttgcatcag cagttacagg aagagccctg 780
tagaaaacaa ataacttcct tatggtcatt caacaagtta gggacccagc cagggtgaaa 840
ataatgttag cagcaactac agcaaagatg gctctcgcca cttgcatgat taaaatgtgc 900
caggtactca gatcyaagca ttggatccac attaactcaa ctaatcccta ttacaaggta 960
aaatatatcc gaattttaca gagggaaaac caaggcacag agaggctaag tagcttgacc 1020

aggatcacac agctaataat cactgacata gctgggattt aaacataagc agttacctcc 1080
atagatcaca ctatgaccac catgccactg ttccttctca agagttccag gatcctgtct 1140
gtccagttct ctttaaagag gacaacacat ctgacattgc taccttgagg taacatttga 1200
aatagtgggt agacatatgt tttaagtttt attcttrctt tttatgygtg tgtgtttggg 1260
gggccaccac agtgtatggg tggagataag gggacaactt aagaattggt cctttctccc 1320
accacatggg tgctgaggtc tgaactcagg tcatcaggat tggcacaaat ccctttaccc 1380
actgagccat ttcactggtc caatatatgt gtgcttttaa gaggctttaa ctattttccc 1440
agatgtgaat gtcctgctga tcattatccc cttttacccg gaagccctct gggaggtgcc 1500
atccctgtgg tcgtctgcat acaaatgggg aaactgcaac tcagagaaac aaggctactt 1560
gccagggccc cacaagtaag ataggctggg atgccatccc agactggcca cactccctgg 1620
cctgtgcttc aagccagttt actttgttcc tgcccattgg aagttagcat gttgcagtca 1680
aacacaataa ctacaggcca aaagtgcttt taaattaaag tcagatgaac ttttaaacat 1740
ccagagctcc tcaactgcag gagttacaac ctgattctgc aaccatcttt gcagtgcccg 1800
gtagtcatat gtagctagag gctcttggct aggacagcat gtgttaggaa acatctggcc 1860
ctgagatcat tgaattgagt gactgctggg tgacaaagac caaggcatcc gttccctgag 1920
agtcctgggc aagcagcaat gtgaccttca tttgtaccta ctcaggttct ttatctgtcc 1980
tgtttgacct acttagtctc ctctggtgtc tcagaggccc aggctgggta ctctggatgt 2040
caggatcagg ccaatgcgca catctgccct agaaatgtcc ccctggttga gcagctcctg 2100
aatccatcgg taaagggtct ggaccaggga ggagtcagat aaaaagctga cagcactggg 2160
ggactccatg gggaactccc acctgccccc acacatccat cctaagagaa ctggtattcc 2220
ttgtttcctc tttgtcctac aaggcaccct gggatcccac ttcagtctcc cagccttgcc 2280
agggttagag ggcatgagcc tccttgtggg gaatttagat gcaagaaggt acagtcacta 2340
gagaacctga gctcagatcc ccaaagtaac cagtacctga tagtgaggca gctgagaacc 2400
gcagcagcct gcctgagtgg ctgaactctg cggcctccgg aactggcccc aactgttggg 2460
tctcctcttc cttcctcctg tgagggaggg cccatctctg ataagtgctg tggggactct 2520
agagtaggga ggaggaggag caatctaagc aggccttact gagaagtcct tgctggcatg 2580
tggctgcctg aggagtacag actgggaaca cccatttgaa tgagtaaggt ttttcctgaa 2640
ggccatgggg agccacggag gaaaatcatt ttagttacaa gacaaagagt agattggtta 2700
acatgggagc arggacatgg ccccaatttt cattgatgaa ggaaattgga actcrgagag 2760
gttaagtaac ttctcccaaa tagctcagct tcataatcac agaacagtca gagtctagat 2820
ctctctgatg cctgtgatgg tcctgccatt ccatgttgct gatccctgtg gcatcagtaa 2880
gcctctacct tgtgggaatg caggatctaa atgaagagag raagtgctgg ccccatgctg 2940
tggtctggaa agctatgcag gctctttgag cagagagtga cccacaagtg aatagagtcc 3000
tatgagactc aaagcaacat ccacccttaa gcagctctaa ccaaatgctc acactgaggg 3060
agccaaagcc aagttagagt cctgtgcttg cccaaggtca ctttgcctgg ccctcctcct 3120
atagcacccg tgttatctta tagccctcat tacagtgatt acaattataa ttagagaggt 3180
aacagggcca cactgtcctt acacattccc ctgctagatt gtagctggga gaggggggaga 3240
tgtaggtggc tgggggagtg ggagggaaga tgcagatttt cattctgggc tctactccct 3300

cagccatttt ttggtgtggg agttagactt tggatatgtt gatgatgagg taagggccac 3360
agaacagtct gaactgtggt atcagaatcc tgtccctctc cctctctcct catccctctt 3420
caccttgtca ctcctctgtc tgctacaggt ggtttctggc tgggtataga ccaagaggga 3480
gctgagggca ccctgtccct cataggcacc atcttcgggg tgctggccag cctctgcgtc 3540
tccctcaatg ccatctatac caagaaggtg ctcccagcag tggacaacag catctggcgc 3600
ctaaccttct ataacaatgt caatgcctgt gtgctcttct tgcccctgat ggttctgctg 3660
ggtgagctcc gtgccctcct tgactttgct catctgtaca gtgcccactt ctggctcatg 3720
atgacgctgg gtggcctctt cggctttgcc attggctatg tgacaggact gcagatcaaa 3780
ttcaccagtc ccctgaccca caatgtatca ggcacagcca aggcctgtgc gcagacagtg 3840
ctggccgtgc tctactatga agagactaag agcttcctgt ggtggacaag caacctgatg 3900
gtgctgggtg gctcctcagc ctatacctgg gtcaggggct gggagatgca gaagacccaa 3960
gaggacccca gctccaaaga gggtgagaag agtgctattg gggtgtgagc ttcttcaggg 4020
acctgggact gaacccaag 4039

【図面の簡単な説明】

第１図は、精製した５種類の抗ＧＤ３キメラ抗体のＳＤＳ－ＰＡＧＥ（４～１５％グラジエントゲルを使用）の電気泳動パターンを示した写真である。第１Ａ図が非還元条件、第１Ｂ図が還元条件でそれぞれ電気泳動を行った写真である。レーン１が高分子量マーカー、２がＹＢ２／０－ＧＤ３キメラ抗体、３がＣＨＯ／ＤＧ４４－ＧＤ３キメラ抗体、４がＳＰ２／０－ＧＤ３キメラ抗体、５がＮＳＯ－ＧＤ３キメラ抗体（３０２）、６がＮＳＯ－ＧＤ３キメラ抗体（ＧＩＴ）、７が低分子量マーカーの泳動パターンをそれぞれ示す。

第２図は、精製した５種類の抗ＧＤ３キメラ抗体のＧＤ３との結合活性を抗体濃度を変化させて測定した図である。縦軸はＧＤ３との結合活性、横軸は抗体濃度をそれぞれ示す。○がＹＢ２／０－ＧＤ３キメラ抗体、●がＣＨＯ／ＤＧ４４－ＧＤ３キメラ抗体、□がＳＰ２／０－ＧＤ３キメラ抗体、■がＮＳＯ－ＧＤ３キメラ抗体（３０２）、△がＮＳＯ－ＧＤ３キメラ抗体（ＧＩＴ）の活性をそれぞれ示す。

第３図は、精製した５種類の抗ＧＤ３キメラ抗体のヒトメラノーマ細胞株Ｇ－３６１に対するＡＤＣＣ活性を示した図である。縦軸に細胞障害活性、横軸に抗体濃度をそれぞれ示す。○がＹＢ２／０－ＧＤ３キメラ抗体、●がＣＨＯ／ＤＧ４４－ＧＤ３キメラ抗体、□がＳＰ２／０－ＧＤ３キメラ抗体、■がＮＳＯ－ＧＤ３キメラ抗体（３０２）、△がＮＳＯ－ＧＤ３キメラ抗体（ＧＩＴ）の活性をそれぞれ示す。

第４図は、ロット２の抗ＧＤ３キメラ抗体から調製したＰＡ化糖鎖を、逆相ＨＰＬＣで分析して得た溶離図を示した図である。縦軸に相対蛍光強度、横軸に溶出時間をそれぞれ示す。

第５図は、還元末端のＮ－アセチルグルコサミンの６位にフコースの１位がα結合していない糖鎖の割合が異なる６種類の抗ＧＤ３キメラ抗体のＧＤ３に対する結合活性を抗体濃度を変化させて測定した図である。縦軸はＧＤ３との結合活性、横軸は抗体濃度をそれぞれ示す。●が抗ＧＤ３キメラ抗体（５０％）、□が抗ＧＤ３キメラ抗体（４５％）、■が抗ＧＤ３キメラ抗体（２９％）、△が抗ＧＤ３キメラ抗体（２４％）、▲が抗ＧＤ３キメラ抗体（１３％）、×が抗ＧＤ３キメラ抗体（７％）の活性をそれぞれ示す。

第６図は、各ドナーのエフェクター細胞を用いたＡＤＣＣ活性の結果である。第６Ａ図はドナーＡ、第６Ｂ図はドナーＢのエフェクター細胞を用いた、還元末端のＮ－アセチルグルコサミンの６位にフコースの１位がα結合していない糖鎖の割合が異なる６種類の抗ＧＤ３キメラ抗体のヒトメラノーマ細胞株Ｇ－３６１に対するＡＤＣＣ活性を示した図である。縦軸に細胞障害活性、横軸に抗体濃度をそれぞれ示す。●が抗ＧＤ３キメラ抗体（５０％）、□が抗ＧＤ３キメラ抗体（４５％）、■が抗ＧＤ３キメラ抗体（２９％）、△が抗ＧＤ３キメラ抗体（２４％）、▲が抗ＧＤ３キメラ抗体（１３％）、×が抗ＧＤ３キメ

ラ抗体（７％）の活性をそれぞれ示す。
第７図は、ドナーＡおよびドナーＢの還元末端のＮ－アセチルグルコサミンの６位にフコースの１位がα結合していない糖鎖含量とＡＤＣＣ活性とを示した図である。
第８図は、６種類の抗ＣＣＲ４キメラ抗体から調製したＰＡ化糖鎖を、逆相ＨＰＬＣで分析して得た溶離図を示したものである。縦軸に相対蛍光強度、横軸に溶出時間をそれぞれ示す。
第９図は、還元末端のＮ－アセチルグルコサミンの６位にフコースの１位がα結合していない糖鎖の割合が異なる６種類の抗ＣＣＲ４キメラ抗体のＣＣＲ４に対する結合活性を抗体濃度を変化させて測定した図である。縦軸はＣＣＲ４との結合活性、横軸は抗体濃度をそれぞれ示す。■が抗ＣＣＲ４キメラ抗体（４６％）、□が抗ＣＣＲ４キメラ抗体（３９％）、▲が抗ＣＣＲ４キメラ抗体（２７％）、△が抗ＣＣＲ４キメラ抗体（１８％）、●が抗ＣＣＲ４キメラ抗体（９％）、○が抗ＣＣＲ４キメラ抗体（８％）の活性をそれぞれ示す。
第１０図は、ドナーＡのエフェクター細胞を用いた、還元末端のＮ－アセチルグルコサミンの６位にフコースの１位がα結合していない糖鎖の割合が異なる抗ＣＣＲ４キメラ抗体のＣＣＲ４／ＥＬ－４細胞に対するＡＤＣＣ活性を示した図である。エフェクター細胞には、ドナーＡのエフェクター細胞を用いた。縦軸に細胞障害活性、横軸に抗体濃度をそれぞれ示す。■が抗ＣＣＲ４キメラ抗体（４６％）、□が抗ＣＣＲ４キメラ抗体（３９％）、▲が抗ＣＣＲ４キメラ抗体（２７％）、△が抗ＣＣＲ４キメラ抗体（１８％）、●が抗ＣＣＲ４キメラ抗体（９％）、○が抗ＣＣＲ４キメラ抗体（８％）の活性をそれぞれ示す。
第１１図は、ドナーＢのエフェクター細胞を用いた、還元末端のＮ－アセチルグルコサミンの６位にフコースの１位がα結合していない糖鎖の割合が異なる抗ＣＣＲ４キメラ抗体のＣＣＲ４／ＥＬ－４細胞に対するＡＤＣＣ活性を示した図である。エフェクター細胞には、ドナーＢのエフェクター細胞を用いた。縦軸に細胞障害活性、横軸に抗体濃度をそれぞれ示す。■が抗ＣＣＲ４キメラ抗体（４６％）、□が抗ＣＣＲ４キメラ抗体（３９％）、▲が抗ＣＣＲ４キメラ抗体（２７％）、△が抗ＣＣＲ４キメラ抗体（１８％）、●が抗ＣＣＲ４キメラ抗体（９％）、○が抗ＣＣＲ４キメラ抗体（８％）の活性をそれぞれ示す。
第１２図は、プラスミドＣＨＦＴ８－ｐＣＲ２．１およびＹＢＦＴ８－ｐＣＲ２．１の構築を示した図である。
第１３図は、プラスミドＣＨＡｃ－ｐＢＳおよびＹＢＡｃ－ｐＢＳの構築を示した図である。
第１４図は、プラスミドＣＨＦＴ８ｄ－ｐＣＲ２．１およびＹＢＦＴ８ｄ－ｐＣＲ２．１の構築を示した図である。
第１５図は、プラスミドＣＨＡｃｄ－ｐＢＳおよびＹＢＡｃｄ－ｐＢＳの構築を示した図である。
第１６図は、競合的ＰＣＲ法を用いた各宿主細胞株におけるα１，６－フコシルトランスフェラーゼ（ＦＵＴ８）転写産物量の定量結果を示した図である。ラットＦＵＴ８配列をスタンダード、内部コントロールに用いた場合の各宿主細胞株におけるＦＵＴ８転写産物の量を示す。■がＣＨＯ細胞株、□がＹＢ２／０細胞株を宿主細胞として用いた結果をそれぞれ示す。
第１７図は、レクチン耐性株が生産した抗ＣＣＲ４キメラ抗体のＡＤＣＣ活性を評価した結果を示した図である。縦軸に細胞障害活性、横軸に抗体濃度をそれぞれ示す。□は５－０３株、■はＣＨＯ／ＣＣＲ４－ＬＣＡ株、◆はＣＨＯ／ＣＣＲ４－ＡＡＬ株、▲はＣＨＯ／ＣＣＲ４－ＰＨＡ株が生産した抗体の活性をそれぞれ示す。
第１８図は、レクチン耐性株が生産した抗ＣＣＲ４キメラ抗体のＡＤＣＣ活性を評価した結果を示したものである。縦軸に細胞障害活性、横軸に抗体濃度をそれぞれ示す。□はＹＢ２／０株（ＫＭ２７６０＃５８－３５－１６）、△は５－０３株、●はＣＨＯ／ＣＣＲ４－ＬＣＡ株が生産した抗体の活性をそれぞれ示す。

第１９図は、精製した抗ＣＣＲ４キメラ抗体から調製したＰＡ化糖鎖を、逆相ＨＰＬＣで分析して得た溶離図を示した図である。縦軸に相対蛍光強度、横軸に溶出時間をそれぞれ示す。２７Ａ図は５－０３株が生産する抗体、２７Ｂ図はＣＨＯ／ＣＣＲ４－ＬＣＡ株が生産する抗体、２７Ｃ図はＣＨＯ／ＣＣＲ４－ＡＡＬ株が生産する抗体、および２７Ｄ図はＣＨＯ／ＣＣＲ４－ＰＨＡ株が生産した抗体の分析結果を示す。

第２０図は、ＣＨＯ細胞由来ＧＭＤの発現ベクター構築（全６工程）の第１の工程を示した図である。

第２１図は、ＣＨＯ細胞由来ＧＭＤの発現ベクター構築（全６工程）の第２の工程を示した図である。

第２２図は、ＣＨＯ細胞由来ＧＭＤの発現ベクター構築（全６工程）の第３の工程を示した図である。

第２３図は、ＣＨＯ細胞由来ＧＭＤの発現ベクター構築（全６工程）の第４の工程を示した図である。

第２４図は、ＣＨＯ細胞由来ＧＭＤの発現ベクター構築（全６工程）の第５の工程を示した図である。

第２５図は、ＣＨＯ細胞由来ＧＭＤの発現ベクター構築（全６工程）の第６の工程を示した図である。

第２６図は、ＧＭＤを発現させたＣＨＯ／ＣＣＲ４－ＬＣＡ株のＬＣＡレクチンに対する耐性度を示した図である。ＬＣＡレクチンを添加せずに培養した細胞群の生存率を１００％とし、２回測定を行った図である。図中２４９は、発現ベクターｐＡＧＥ２４９を導入したＣＨＯ／ＣＣＲ４－ＬＣＡ株のＬＣＡレクチンに対する生存率を示す。ＧＭＤはＧＭＤ発現ベクターｐＡＧＥ２４９ＧＭＤを導入したＣＨＯ／ＣＣＲ４－ＬＣＡ株のＬＣＡレクチンに対する耐性度を示す。

第２７図は、ＧＭＤを発現させたＣＨＯ／ＣＣＲ４－ＬＣＡ株の細胞群が生産した抗ＣＣＲ４キメラ抗体のＡＤＣＣ活性を示した図である。縦軸に細胞障害活性、横軸に抗体濃度をそれぞれ示す。

第２８図は、ＧＭＤ遺伝子を発現させたＣＨＯ／ＣＣＲ４－ＬＣＡ株より精製した抗ＣＣＲ４キメラ抗体から調製したＰＡ化糖鎖を、逆相ＨＰＬＣで分析して得た溶離図を示した図である。縦軸に相対蛍光強度、横軸に溶出時間をそれぞれ示す。

第２９図は、精製したｓｈＦｃγＲＩＩＩａの還元条件下でのＳＤＳ－ＰＡＧＥ（４～１５％グラジエントゲルを使用）の電気泳動パターンを示した写真である。レーン１がｓｈＦｃγＲＩＩＩａ、レーンＭが分子量マーカーの泳動パターンをそれぞれ示す。

第３０図は、各種抗ＧＤ３キメラ抗体のｓｈＦｃγＲＩＩＩａに対する結合活性を示した図である。縦軸に結合活性、横軸に抗体濃度をそれぞれ示す。○が抗ＧＤ３キメラ抗体（４５％）、●が抗ＧＤ３キメラ抗体（７％）の活性をそれぞれ示す。

第３１図は、各種抗抗線維芽細胞増殖因子－８（ＦＧＦ－８）キメラ抗体のｓｈＦｃγＲＩＩＩａに対する結合活性を示した図である。縦軸に結合活性、横軸に抗体濃度をそれぞれ示す。○が抗ＦＧＦ－８キメラ抗体（５８％）、●が抗ＦＧＦ－８キメラ抗体（１３％）の活性をそれぞれ示す。

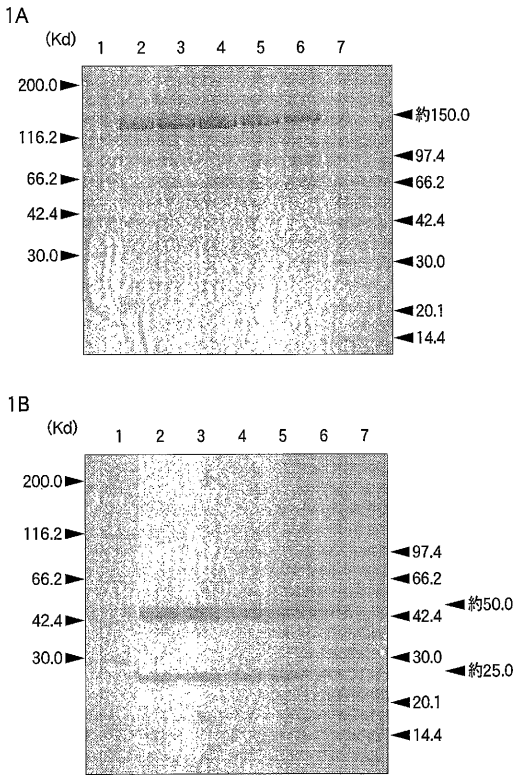
第３２図は、各種抗ＣＣＲ４キメラ抗体のｓｈＦｃγＲＩＩＩａに対する結合活性を示した図である。第３２Ａ図は、縦軸に結合活性、横軸に抗体濃度をそれぞれ示す。○が抗ＣＣＲ４キメラ抗体（８７％）、●が抗ＣＣＲ４キメラ抗体（４６％）、□が抗ＣＣＲ４キメラ抗体（３９％）、■が抗ＣＣＲ４キメラ抗体（２７％）、△が抗ＣＣＲ４キメラ抗体（１８％）、▲が抗ＣＣＲ４キメラ抗体（９％）、×が抗ＣＣＲ４キメラ抗体（８％）の活性をそれぞれ示す。第３２Ｂ図は、縦軸に結合活性、横軸に還元末端のＮ－アセチルグルコサミンの６位にフコースの１位がα結合していない糖鎖の割合をそれぞれ示した結果である。●が抗体濃度が４０μｇ／ｍＬ、○が抗体濃度が４μｇ／ｍＬの活性をそれぞれ示す。

第３３図は、各種抗ＣＣＲ４キメラ抗体のｓｈＦｃγＲＩＩＩａに対する結合活性を示した図である。縦軸に結合活性、横軸に抗体濃度をそれぞれ示す。○が抗ＣＣＲ４キメラ抗

体（８７％）、が抗ＣＣＲ４キメラ抗体（４８％）、●が抗ＣＣＲ４キメラ抗体（８％）の活性をそれぞれ示す。
第３４図は、各種抗ＧＤ３キメラ抗体のヒトメラノーマ細胞株Ｇ－３６１に対するＡＤＣＣ活性を示した図である。縦軸に細胞障害活性、横軸に抗体濃度をそれぞれ示す。▲が抗ＧＤ３キメラ抗体（４２％）、●が抗ＧＤ３キメラ抗体（７％）の活性をそれぞれ示す。
第３５図は、ＦＧＦ－８／Ｆｃ融合蛋白質のＫＭ１３３４に対する結合活性を測定した結果を示した図である。縦軸に結合活性、横軸に抗体濃度をそれぞれ示す。■がＹＢ２／０細胞株、○がＣＨＯ／ＤＧ４４細胞株を宿主細胞として生産されたＦＧＦ－８／Ｆｃ融合蛋白質の活性の結果をそれぞれ示す。
第３６図は、各種のＦＧＦ－８／Ｆｃ融合蛋白質のｓｈＦｃγＲＩＩＩａ（Ｖ）に対する結合活性を測定した結果を示した図である。縦軸に結合活性、横軸に抗体濃度をそれぞれ示す。■がＹＢ２／０細胞株、○がＣＨＯ／ＤＧ４４細胞株を宿主細胞として生産されたＦＧＦ－８／Ｆｃ融合蛋白質の活性の結果をそれぞれ示す。
第３７図は、ＣＨＯ細胞由来のＧＭＤ　ｃＤＮＡクローン２２－８の５’末端にクローン３４－２の５’末端を導入したプラスミドＣＨＯ－ＧＭＤの作製工程を示した図である。
第３８図は、プラスミドｐＫＡＮＴＥＸ１３３４ＨおよびプラスミドｐＫＡＮＴＥＸ１３３４の造成工程を示した図である。

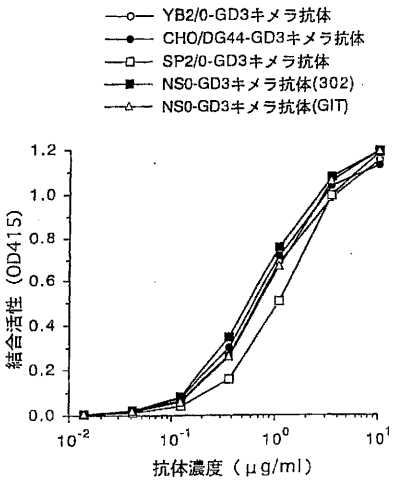
【図１】

第１図



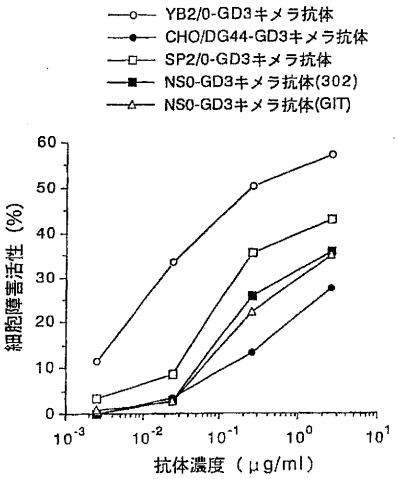
【図２】

第２図



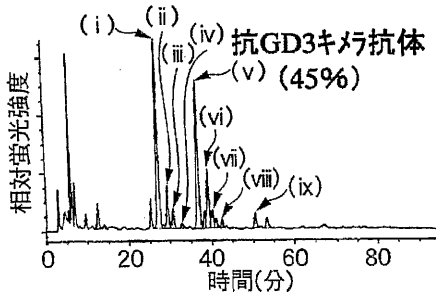
【図３】

第３図



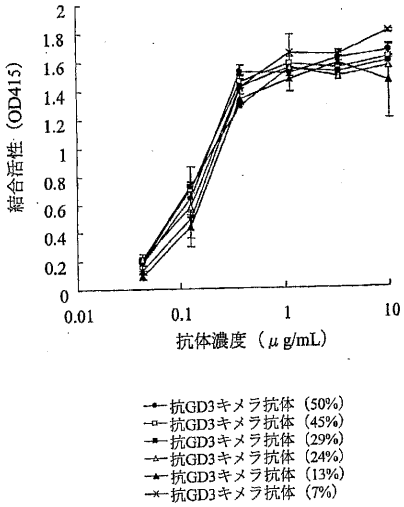
【図４】

第４図



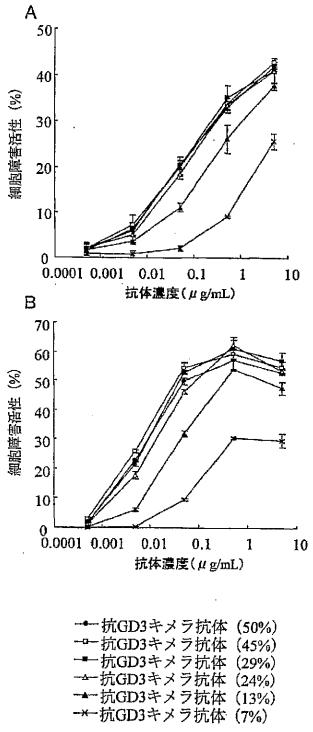
【図５】

第５図



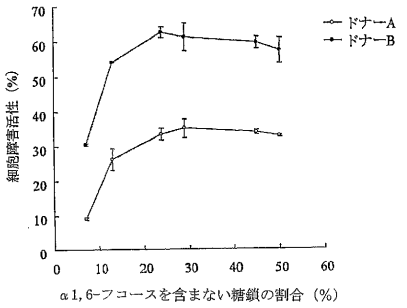
【図６】

第６図



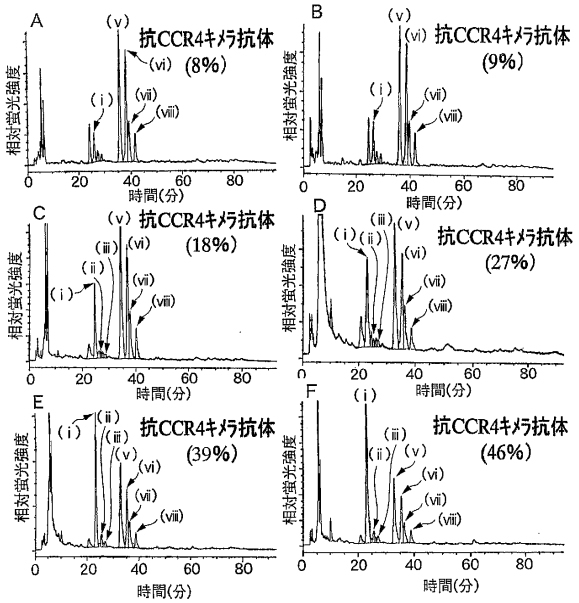
【図７】

第７図



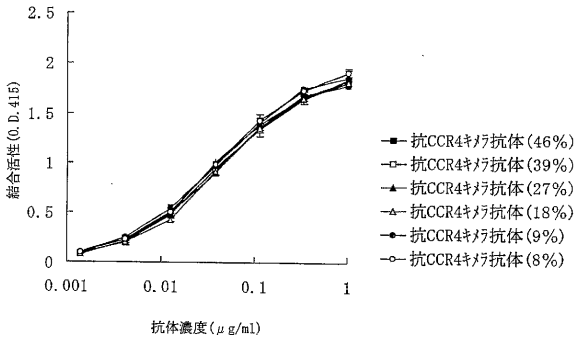
【図８】

第８図



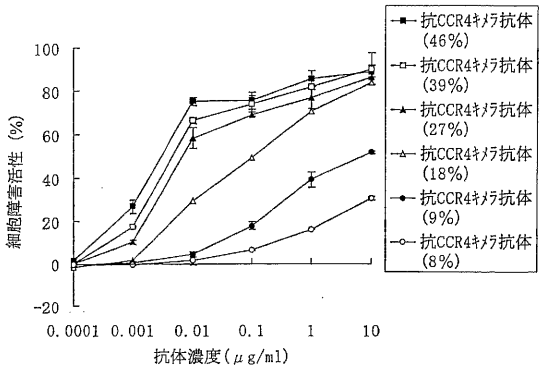
【図９】

第９図



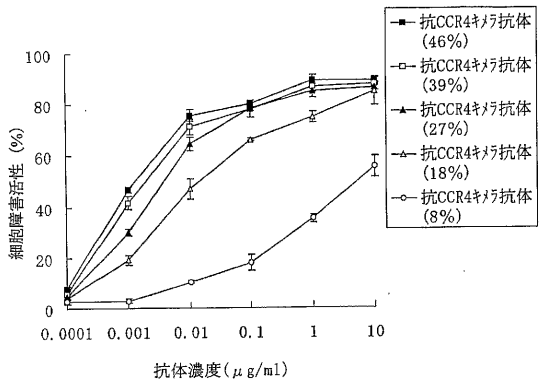
【図１０】

第１０図



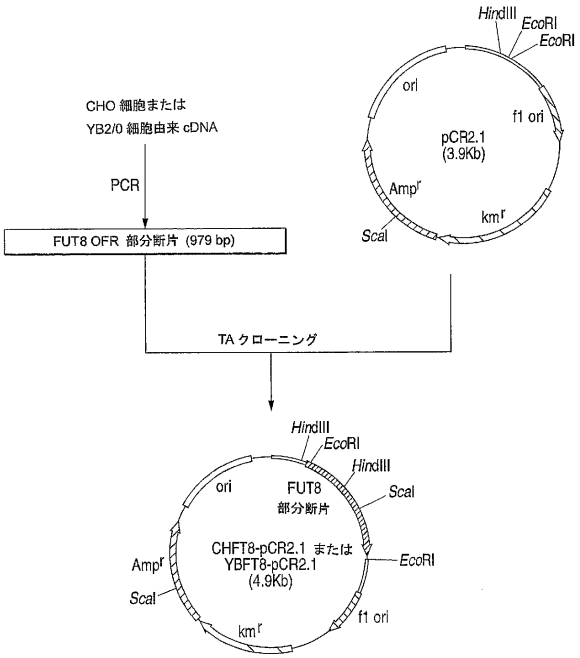
【図１１】

第１１図



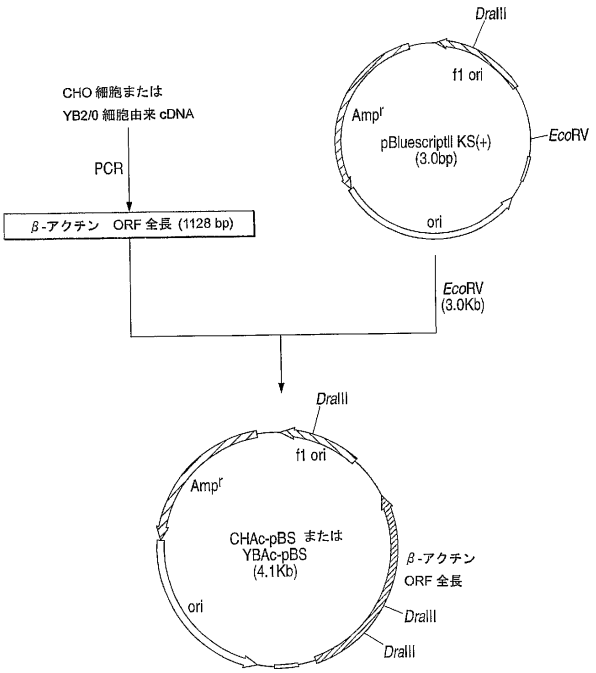
【図１２】

第１２図



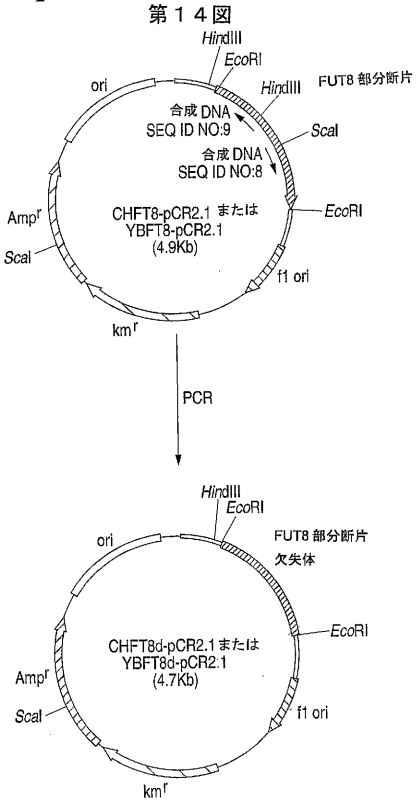
【図１３】

第１３図



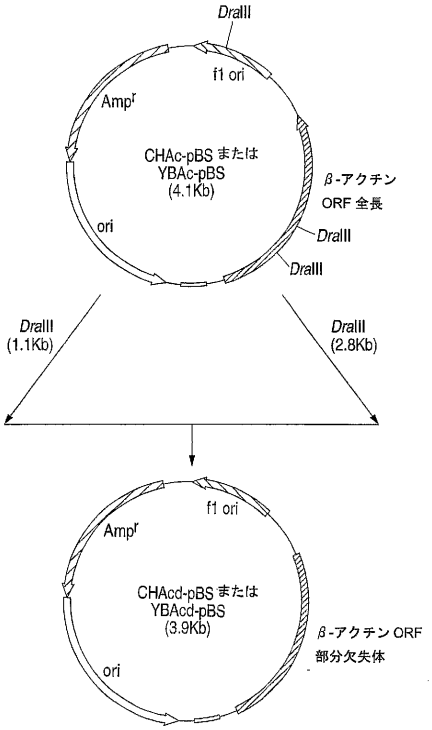
【図１４】

第１４図



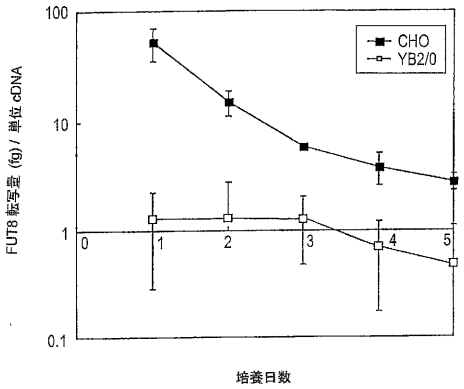
【図１５】

第１５図



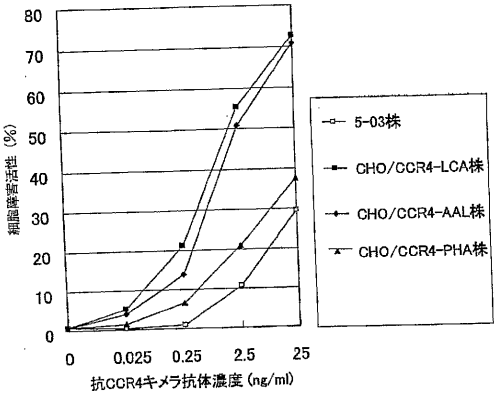
【図１６】

第１６図



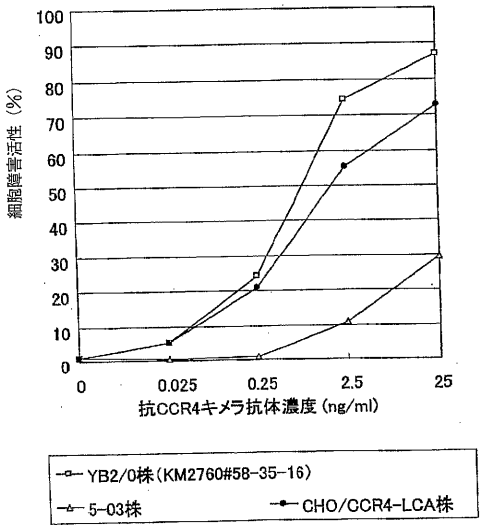
【図１７】

第１７図



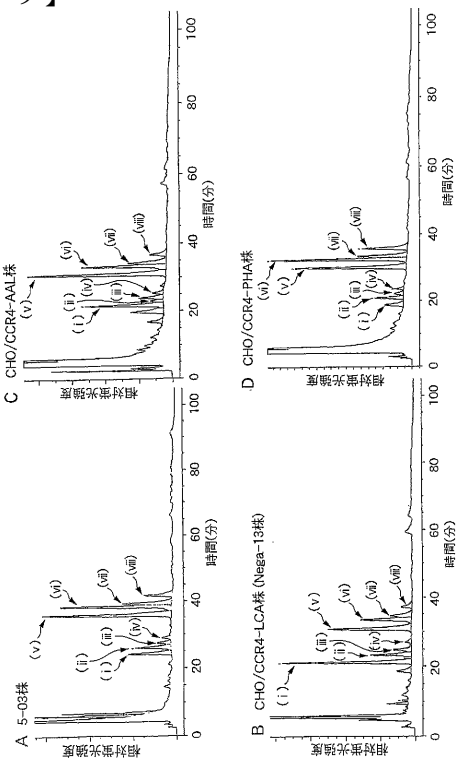
【図１８】

第１８図



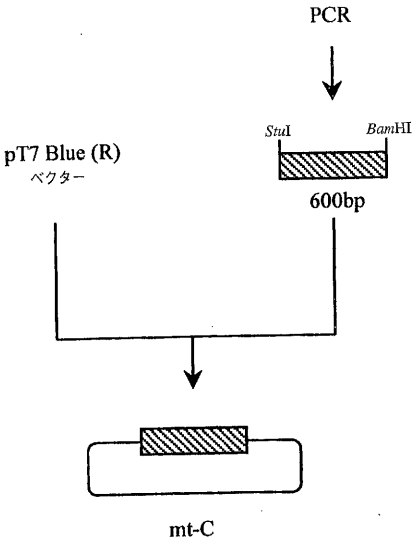
【図１９】

第１９図



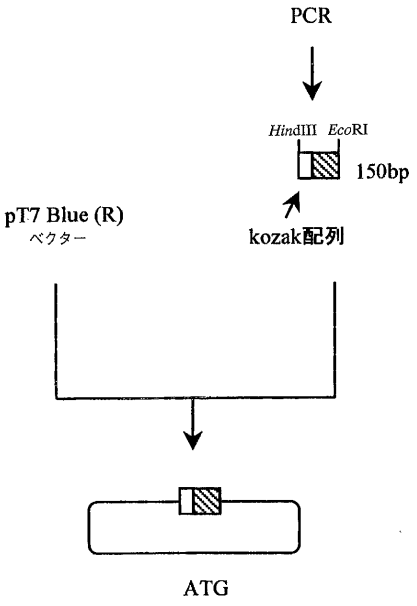
【図２０】

第２０図



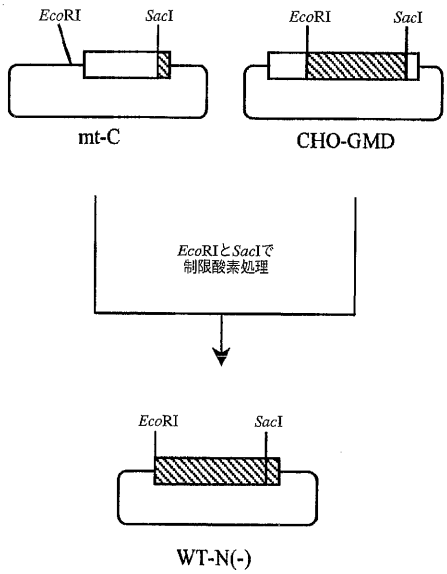
【図２１】

第２１図



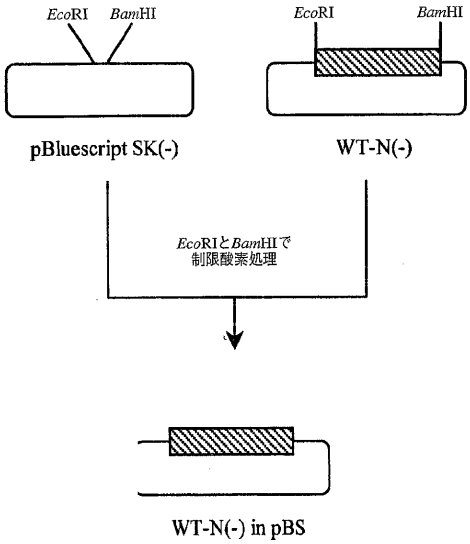
【図２２】

第２２図



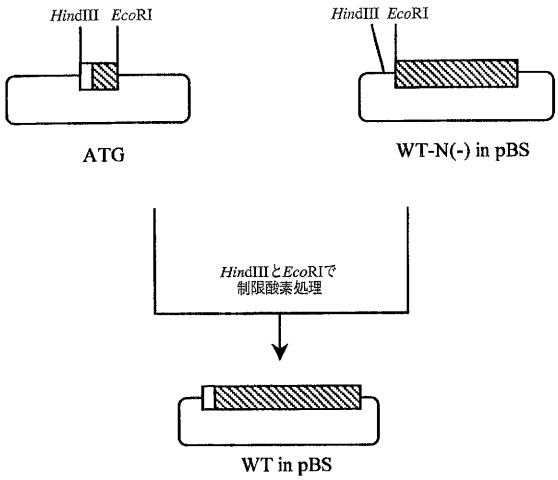
【図２３】

第２３図



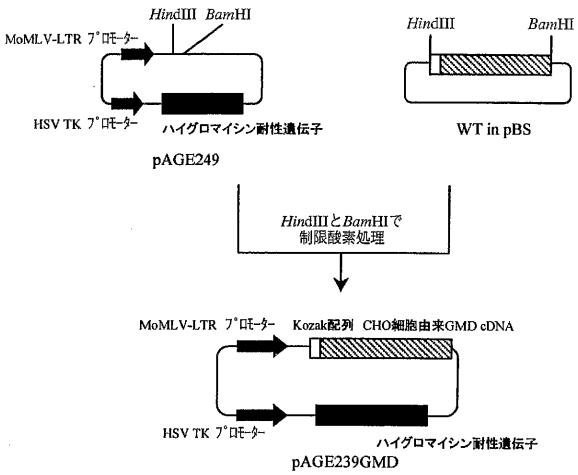
【図２４】

第２４図



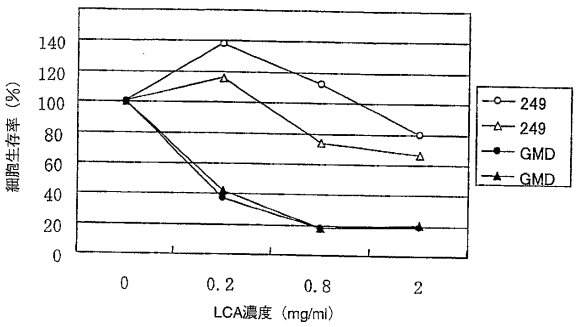
【図２５】

第２５図



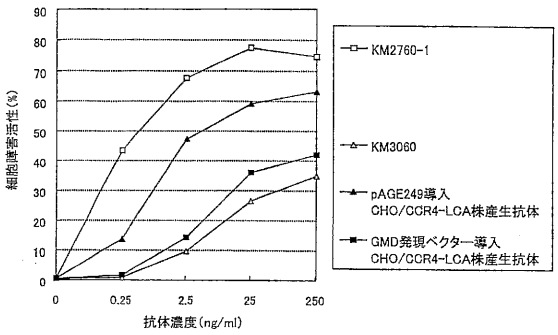
【図２６】

第２６図



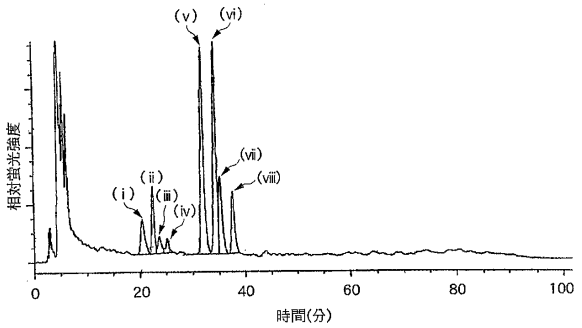
【図２７】

第２７図



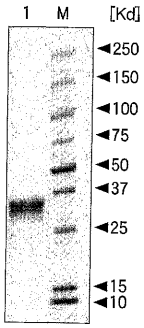
【図２８】

第２８図



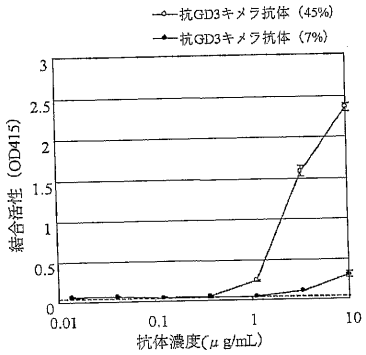
【図２９】

第２９図



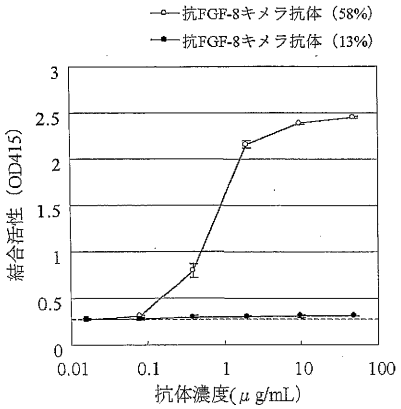
【図３０】

第３０図



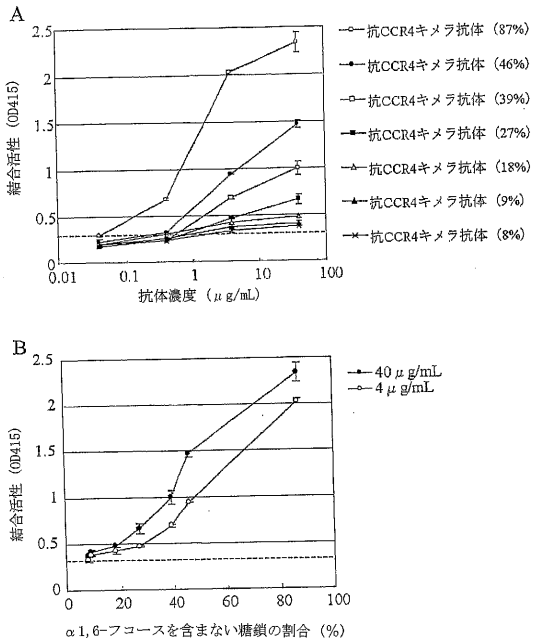
【図３１】

第３１図



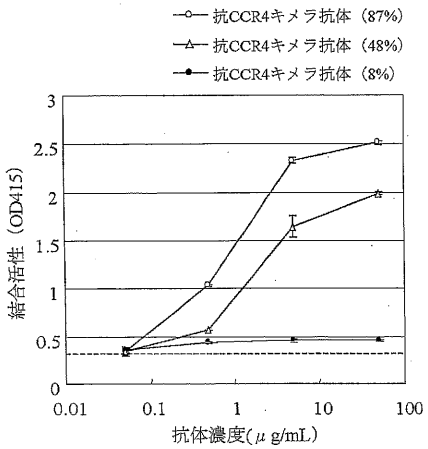
【図３２】

第３２図



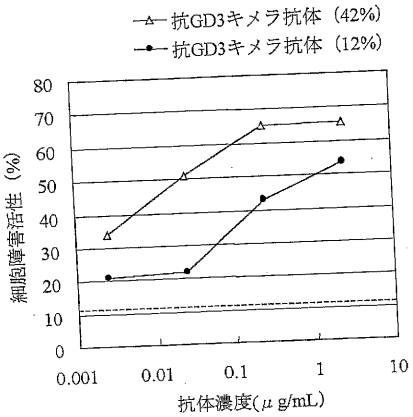
【図３３】

第３３図



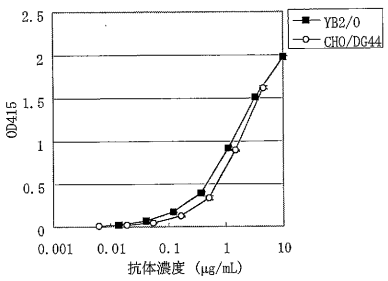
【図３４】

第３４図



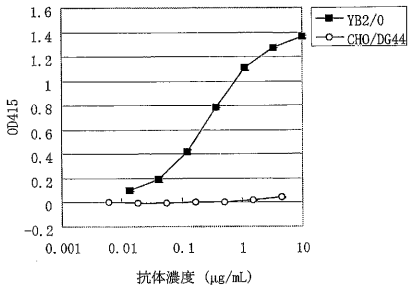
【図３５】

第３５図



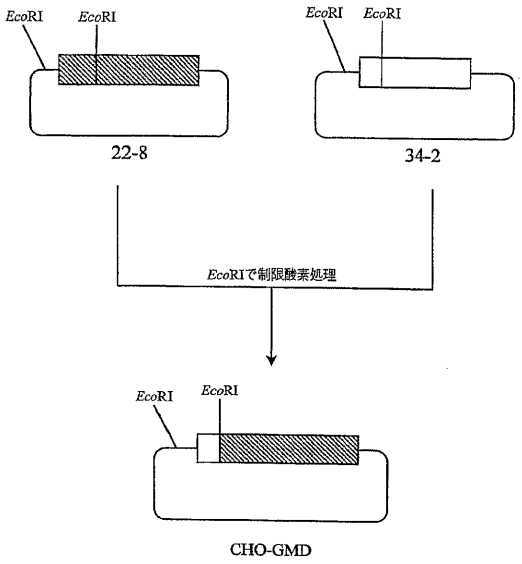
【図３６】

第３６図



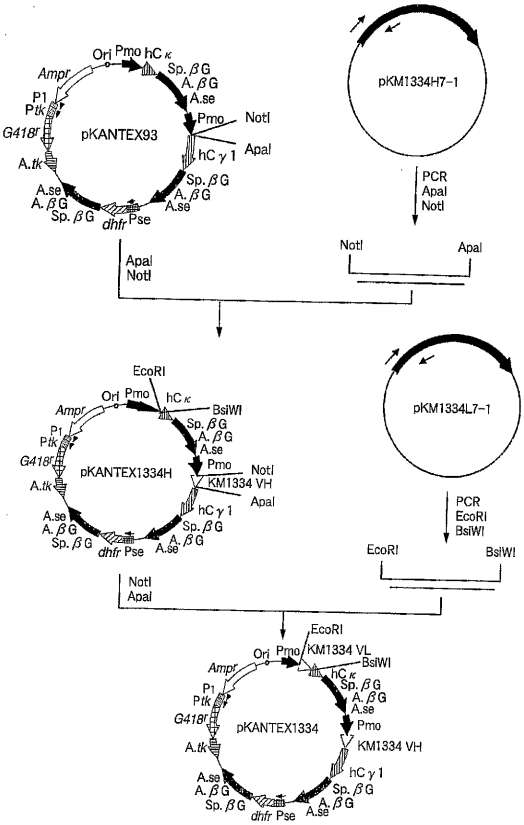
【図３７】

第３７図



【図３８】

第３８図



【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP03/04504

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
Int.Cl[7] C12P21/08, C12N15/09, C12N5/10, C07K16/18, G01N33/50, C07K16/46//A61K39/395, A61P9/00, A61P29/00, A61P31/04, A61P31/12, A61P31/14, A61P35/00, A61P37/02, A61P37/04,
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
Int.Cl[7] C12P21/08, C12N15/09, C12N5/10, C07K16/18, G01N33/50, C07K16/46

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X/Y/A	WO 00/61739 A1 (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd.), 19 October, 2000 (19.10.00), & EP 117619 A1 & AU 3672800 A	1-4,9-16, 21-25,27,29, 31,33,34,36, 39-43,45,48/ 5-8,17-20, 30,32,35,37, 38,44,46,47/ 26,28
Y	Ripka J. et al., Two Chinese hamster ovary glycosylation mutants affected in the conversion of GDP-mannose to GDP-fucose, Arch.Biochem. Biophys., 1986, 249(2), pages 533 to 545	5-8,17-20, 30,32,35,38, 44,47

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier document but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
23 May, 2003 (23.05.03)	22 July, 2003 (22.07.03)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1998)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP03/04504

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Shitara K. et al., A new vector for the high level expression of chimeric antibodies in myeloma cells, J.Immunol.Methods, 1994, 167(1-2), pages 271 to 278	1-25,30-45, 47,48
X	Davies J. et al., Expression of GnTIII in a recombinant anti-CD20 CHO production cell line: Expression of antibodies with altered glycoforms leads to an increase in ADCC through higher affinity for FC gamma RIII, Biotechnol.Bioeng., 2001, 74(4), pages 288 to 294	1,27,29
Y	Hackett J. Jr. et al., Recombinant mouse-human chimeric antibodies as calibrators in immunoassays that measure antibodies to Toxoplasma gondii, J. Clin.Microbiol., 1998, 36(5), pages 1277 to 1284	37,46
Y	Elbashir SM. et al., Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells, Nature, 2001, 411(6836), pages 494 to 498	5-8,17-20, 30,32,35,38, 44,47
A	WO 97/27303 A (Toyobo Co., Ltd.), 31 July, 1997 (31.07.97), & US 6054304 A & EP 816503 A1 & JP 9-201191 A	1-48
A	Shields RL. et al., High resolution mapping of the binding site on human IgG1 for Fc gamma RI, Fc gamma RII, Fc gamma RIII, and FcRn and design of IgG1 variants with improved binding to the Fc gamma R, J.Biol.Chem., 2001, 276(9), pages 6591 to 6604	1-48
P,X	Shields RL. et al., Lack of fucose on human IgG1 N-linked oligosaccharide improves binding to human Fc gamma RIII and antibody-dependent cellular toxicity, J.Biol.Chem., 2002 Jul., 277(30), pages 26733 to 26740	1-48
P,X	SHINKAWA, T. et al., The absence of fucose but not the presence of galactose or bisecting N-acetylglucosamine of human IgG1 complex-type oligosaccharides shows the critical role of enhancing antibody-dependent cellular cytotoxicity, J.Biol.Chem., 2003, 278(5), pages 3466 to 3473	1-48
P,X	WO 02/31140 A1 (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd.), 18 April, 2002 (18.04.02), & AU 9419801 A	1-48

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 1998)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP03/04504

Continuation of A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
(International Patent Classification (IPC))

Int.Cl[7] A61P37/08, A61P43/00, G01N33/15, (C12P21/08, C12R1:91), (C12N5/10, C12R1:91)

(According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC)

Continuation of B. FIELDS SEARCHED
Minimum Documentation Searched(International Patent Classification (IPC))

Int.Cl[7]

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

国際調査報告

国際出願番号 PCT／JP03／04504

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC））
Int.Cl' C12P 21/08, C12N 15/09, C12N 5/10, C07K 16/18, G01N33/50, C07K16/46 // A61K 39/395, A61P 9/00, A61P 29/00, A61P 31/04, A61P 31/12, A61P31/14, A61P 35/00, A61P 37/02, A61P 37/04, A61P 37/08, A61P 43/00, G01N 33/15, (C12P 21/08, C12R 1:91), (C12N 5/10, C12R 1:91)

B. 調査を行った分野
調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC））
Int.Cl' C12P 21/08, C12N 15/09, C12N 5/10, C07K 16/18, G01N33/50, C07K16/46

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）
BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー＊	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求の範囲の番号
X/Y/A	WO 00/61739 A1(協和醗酵工業株式会社), 2000.10.19 & EP 117619 A1 & AU 3672800 A	1-4, 9-16, 21-25, 27, 29, 31, 33, 34, 36, 39-43, 45, 48 / 5-8, 17-20, 30, 32, 35, 37, 38, 44, 46, 47/26, 28
Y	Ripka J et al, Two Chinese hamster ovary glycosylation mutants affected in the conversion of GDP-mannose to GDP-fucose, Arch Biochem Biophys, 1986, 249(2), p. 533-545	5-8, 17-20, 30, 32, 35, 38, 44, 47

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。 ☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

＊ 引用文献のカテゴリー
「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献
「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日 23.05.03	国際調査報告の発送日 22.07.03
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁（ISA／JP） 郵便番号100－8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官（権限のある職員） 光本 美奈子 4B 9359 電話番号 03－3581－1101 内線 3448

様式PCT／ISA／210（第2ページ）（1998年7月）

国際調査報告 | 国際出願番号 PCT/JP03/04504

C (続き). 関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求の範囲の番号
X	Shitara K et al, A new vector for the high level expression of chimeric antibodies in myeloma cells, J Immunol Methods, 1994, 167(1-2), p. 271-278	1-25, 30-45, 47, 48
X	Davies J et al, Expression of GnTIII in a recombinant anti-CD20 CHO production cell line: Expression of antibodies with altered glycoforms leads to an increase in ADCC through higher affinity for FC gamma RIII, Biotechnol Bioeng, 2001, 74(4), p. 288-294	1, 27, 29
Y	Hackett J Jr et al, Recombinant mouse-human chimeric antibodies as calibrators in immunoassays that measure antibodies to Toxoplasma gondii, J Clin Microbiol, 1998, 36(5), p. 1277-1284	37, 46
Y	Elbashir SM et al, Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells, Nature, 2001, 411(6836), p. 494-498	5-8, 17-20, 30, 32, 35, 38, 44, 47
A	WO 97/27303 A (東洋紡績株式会社), 1997.7.31 & US 6054304 A & EP 816503 A1 & JP 9-201191 A	1-48
A	Shields RL et al, High resolution mapping of the binding site on human IgG1 for Fc gamma RI, Fc gamma RII, Fc gamma RIII, and FcRn and design of IgG1 variants with improved binding to the Fc gamma R, J Biol Chem, 2001, 276(9), p. 6591-6604	1-48
PX	Shields RL et al, Lack of fucose on human IgG1 N-linked oligosaccharide improves binding to human Fcgamma RIII and antibody-dependent cellular toxicity, J Biol Chem, 2002 Jul, 277(30), p. 26733-26740	1-48
PX	Shinkawa T et al, The absence of fucose but not the presence of galactose or bisecting N-acetylglucosamine of human IgG1 complex-type oligosaccharides shows the critical role of enhancing antibody-dependent cellular cytotoxicity, J Biol Chem, 2003, 278(5), p. 3466-3473	1-48
PX	WO 02/31140 A1 (協和醗酵工業株式会社) 2002.04.18 & AU 9419801 A	1-48

フロントページの続き

(51)Int.Cl.[7]　　ＦＩ
ＣＩＲＰ　21/02　　ＣＩＲＮ　5/00　　Ａ

(72)発明者　中村　和靖
アメリカ合衆国　２０８５２　メリーランド州ノースベセスダニコルソンレーン５８０１アパートメントナンバー４１６ＭＤ
(72)発明者　設楽　研也
東京都町田市旭町三丁目６番６号　協和醗酵工業株式会社　東京研究所内

（注）この公表は、国際事務局（ＷＩＰＯ）により国際公開された公報を基に作成したものである。なおこの公表に係る日本語特許出願（日本語実用新案登録出願）の国際公開の効果は、特許法第１８４条の１０第１項(実用新案法第４８条の１３第２項）により生ずるものであり、本掲載とは関係ありません。